



ANNEE 2005

THESE : 2005 – TOU 3 – 4123

EFFETS BIOLOGIQUES DES PEROXYDES ET APPROCHE DE LA PARTICIPATION DES ALIMENTS COMPOSÉS À LEUR APPORT CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Cécile, Sophie BONNEFIS

Née, le 12 novembre 1975 à FONTENAY-AUX-ROSES (Hauts-de-Seine)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Francis ENJALBERT

JURY

PRESIDENT :
M. Robert SALVAYRE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Francis ENJALBERT
Mme Nathalie PRIYMENKO

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2005

NOM: BONNEFIS

PRENOM: Cécile

TITRE: EFFETS BIOLOGIQUES DES PEROXYDES ET APPROCHE DE LA PARTICIPATION DES ALIMENTS COMPOSES A LEUR APPORT CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

RESUME: Dans l'organisme des chiens et des chats, les radicaux libres de l'oxygène, notamment les peroxydes, sont des molécules instables responsables de la dénaturation des protéines, acides désoxyribonucléiques et lipides. Ils sont impliqués dans de nombreuses maladies et le processus de vieillissement. Dans les aliments, ils participent au rancissement oxydatif en partie limité par la complémentation en antioxydants.

Dans notre étude, le statut oxydatif d'un panel varié d'aliments composés complets, secs ou humides, destinés aux chiens et aux chats, a été analysé dans le but de déterminer l'indice de peroxyde et l'absorbance des produits conjugués. L'indice de peroxyde de nos échantillons varie en général de façon inverse avec le taux de matières grasses.

Cette étude préliminaire montre la difficulté d'évaluer la détérioration oxydative complète d'un aliment en raison des différents facteurs intervenant lors de sa fabrication et du nombre important de composés résultant de ce phénomène.

MOTS-CLES: Peroxydes – Radicaux libres – Lipides – Rancissement – Alimentation – Chien – Chat

ENGLISH TITTLE: BIOLOGICAL EFFECTS OF PEROXIDES AND APPROACH TO NUTRITIONNALLY COMPLETE FOOD CONTRIBUTION TO THEIR INTAKE IN DOGS AND CATS

ABSTRACT: In the organism of the dogs and cats, oxygen free radicals, especially peroxides, are unstable molecules responsible for the degradation of proteins, deoxyribonucleic acids, and lipids. They are implied in many diseases and ageing. In food, they take part in oxidative rancidity limited by the antioxidant supplementation.

In our experimentation, the oxidative statute of complete dry or wet pet food various panel, intended for the dogs and the cats, was analysed to determine the peroxide value and the absorbance of the combined products. The peroxide value of our samples generally varies in an opposite way with the fat content rate.

This preliminary study shows the difficulty in evaluating the complete oxidative damage of a food sample because of different factors during their manufacture and the number of oxidised products resulting from this phenomenon.

KEY WORDS: Peroxides – Free radicals – Lipids – Rancidity – Food – Dog – Cat

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELF
	M.	M. ECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MARENDI Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
I. LES PEROXYDES : ORIGINE ET EFFETS.....	5
I.1. Les peroxydes dans l'organisme	5
I.1.1. Formation des peroxydes	5
I.1.1.1. Qu'est-ce qu'un peroxyde ?.....	5
I.1.1.1.1. Définition	5
I.1.1.1.2. Etude biochimique	6
I.1.1.2. Formation et facteurs de risques.....	11
I.1.1.2.1. Endogènes	11
I.1.1.2.2. Exogènes	11
I.1.2. Conséquences.....	12
I.1.2.1. Conséquences biologiques.....	12
I.1.2.1.1. Peroxydation des lipides	13
I.1.2.1.2. Dénaturation des protéines.....	14
I.1.2.1.3. Dénaturation de l'ADN.....	14
I.1.2.2. Affections associées	14
I.1.2.3. Théorie du vieillissement.....	18
I.1.3. Systèmes de lutte.....	18
I.1.3.1. Mécanismes	19
I.1.3.1.1. Système préventif.....	19
I.1.3.1.2. Système actif.....	20
I.1.3.1.3. Système passif.....	23
I.1.3.1.4. Système réparateur.....	26
I.1.3.1.5. Système précurseur	26
I.1.3.2. Rôle de l'alimentation	27
I.1.3.2.1. Rôle prooxydant.....	27
I.1.3.2.1.1. Composition	27
I.1.3.2.1.2. Conservation	29
I.1.3.2.2. Rôle antioxydant	29
I.2. Les peroxydes dans l'alimentation	31
I.2.1. Lipides et matières grasses dans la ration	32
I.2.2. Altération des corps gras.....	32
I.2.3. Système de prévention dans la ration.....	35
I.2.4. Mesure du phénomène de rancissement oxydatif	35
II. LES PEROXYDES DANS LES ALIMENTS POUR CHIENS ET CHATS :	
APPROCHE EXPERIMENTALE	37
II.1. Echantillonnage.....	37
II.1.1. Choix des produits testés	37
II.1.2. Etude des échantillons	39
II.1.2.1. Répartition des échantillons en fonction de leur type	39
II.1.2.2. Répartition des échantillons en fonction de l'espèce cible	40
II.1.2.3. Répartition des échantillons en fonction des particularités des animaux destinataires.....	41
II.2. Matériel utilisé	42
II.3. Technique.....	43
II.3.1. Extraction des matières grasses	43
II.3.2. Dosage des peroxydes.....	43

II.3.3. Mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet des diènes et triènes conjugués	45
II.4. Présentation des résultats	46
III. RESULTATS ET DISCUSSION	47
III.1. Etude des résultats IP	47
III.1.1. Résultats IP	48
III.1.2. Indice de peroxyde et espèce destinataire	49
III.1.3. Indice de peroxyde et type d'aliments	50
III.1.3.1. Alimentation sèche	50
III.1.3.2. Alimentation humide	51
III.1.3.3. Comparaison des IP en fonction du type d'aliments	52
III.1.4. Indice de peroxyde et taux de MG	53
III.1.4.1. Alimentation sèche	53
III.1.4.2. Alimentation humide	56
III.2. Pourquoi avoir utilisé l'absorbance UV ?	58
III.2.1. Résultats	58
III.2.2. Interprétation et limites du dosage des diènes et triènes	59
III.2.2.1. Analyse des résultats	59
III.2.2.1.1. Diènes conjugués	59
III.2.2.1.2. Triènes conjugués	60
III.2.2.2. Produits conjugués et espèce destinataire	60
III.2.2.2.1. Diènes conjugués	60
III.2.2.2.2. Triènes conjugués	61
III.2.2.3. Produits conjugués et type d'aliments	61
III.2.2.3.1. Diènes conjugués	61
III.2.2.3.2. Triènes conjugués	62
III.2.2.4. Produits conjugués et IP ou MG	63
III.2.2.4.1. Aliments secs	63
III.2.2.4.2. Aliments humides	65
III.3. Discussion	67
III.3.1. Choix des matières premières	67
III.3.2. Type d'aliment	68
III.3.3. Technique de fabrication	68
III.3.4. Méthode de conservation	69
III.4. Applications	70
III.4.1. Rappel de pathologie	70
III.4.2. Intérêt des antioxydants	70
III.4.2.1. Vitamine E	70
III.4.2.2. Expérimentation	70
CONCLUSION	73
Annexe : Méthode AOAC (dosage des peroxydes)	74
Références bibliographiques	75

INTRODUCTION

Pendant ces quinze dernières années, la teneur en matières grasses n'a cessé d'augmenter dans les aliments industriels pour chiens et pour chats. Ce taux de matières grasses représente actuellement environ 20-25% de la matière sèche (pour un aliment sec physiologique classique) alors qu'auparavant il était d'environ 12 % de la matière sèche. Ce phénomène est lié à deux causes : tout d'abord les progrès technologiques qui ont permis par la méthode d'extrusion une fixation beaucoup plus importante de la matière grasse (formation d'un tissu «éponge» où les matières grasses adhèrent) ; et enfin les industries agro-alimentaires qui ont voulu développer l'appétence de leurs produits. Pour ce faire elles ont choisi un constituant à forte valeur énergétique que sont les acides gras.

Ces matières grasses proviennent aujourd'hui en grande majorité des volailles. Afin de respecter l'équilibre $\omega 3/\omega 6$ des acides gras, le taux d'acides gras poly-insaturés s'est fortement accru par rapport aux acides gras mono-insaturés. Par conséquent le risque d'oxydation de ces substances poly-insaturées est largement augmenté.

Les produits d'oxydation ainsi formés sont nommés les peroxydes. Ces molécules sont très instables et peuvent à leur tour produire des diènes et triènes conjugués. Tous ces composés instables se révèlent toxiques notamment pour les membranes cellulaires. Chez le chien comme chez l'homme, ils semblent impliqués dans la pathogénie de certains cancers et d'autres maladies telles que des troubles cardio-vasculaires comme l'athérosclérose.

Cette thèse a pour but de doser les peroxydes ainsi que les diènes et triènes conjugués dans les aliments pour chiens et chats. L'augmentation excessive des matières grasses dans les aliments du commerce pour chiens et chats est-elle à l'origine d'une quantité importante de peroxydes dans l'aliment, susceptible de créer un stress oxydatif et cela constitue-t-il un risque pour la santé de nos carnivores domestiques ?

Dans notre expérimentation, nous allons étudier la variation de l'indice de peroxydes et la quantité de diènes et triènes en fonction du taux de matière grasse mais aussi des différents facteurs qui caractérisent ces aliments (forme, destinataire,...)

L'étude de l'état oxydatif d'un aliment se révèle très difficile compte tenu de la diversité des produits engendrés par cette altération et du nombre de paramètres dont elle dépend.

I. LES PEROXYDES : ORIGINE ET EFFETS

Le but de cette thèse est d'étudier les peroxydes dans les aliments pour chiens et chats. Afin de mieux appréhender le protocole et l'intérêt de l'expérimentation, un rappel bibliographique de leur nature et de leurs effets est nécessaire.

Les peroxydes se forment et se trouvent dans l'organisme où ils révèlent leur caractère toxique, mais peuvent être produits au sein d'aliments par la suite ingérés.

I.1. Les peroxydes dans l'organisme

Nous allons tout d'abord étudier ces molécules et nous intéresser à la raison de leur apparition in vivo. Dans un second temps, les effets délétères de ces composés sur les organismes vont être exposés, ce qui permettra de mieux comprendre ensuite les méthodes de défense.

Les aliments rancis ou peroxydés augmentent le pool des peroxydes circulants in vivo, sont susceptibles d'engendrer un stress oxydatif et donc d'être impliqués dans diverses affections.

I.1.1. Formation des peroxydes

Les peroxydes sont des molécules instables appelées au sens large radicaux libres de l'oxygène. Cette structure chimique caractéristique les rend dangereux pour l'organisme des individus. Leur apparition se fait essentiellement in vivo mais elle est accentuée par des phénomènes extérieurs : apport de peroxydes par l'alimentation et production plus importante sous l'effet de certains facteurs environnementaux.

I.1.1.1. Qu'est-ce qu'un peroxyde ?

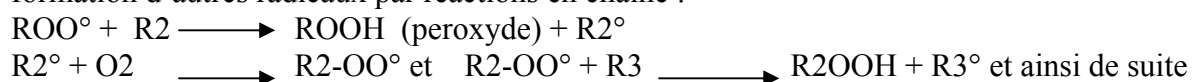
I.1.1.1.1. Définition

Les peroxydes sont des molécules chimiques comportant un ou plusieurs atomes d'oxygène possédant un électron célibataire. Ils appartiennent à un ensemble appelé les radicaux libres de l'oxygène (70) parmi lesquels on distingue :

- les atomes d'oxygène sous une forme de radical libre : anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, radical hydroxyle OH^{\cdot} , oxyde nitrique, peroxydinitrite, radical nitrosyl ;
- ou les atomes d'oxygène sous forme de peroxydes : on parle alors de peroxydes d'hydrogène H_2O_2 ou de peroxydes organiques $ROOH$.

Ce sont des composés chimiquement instables visant à stabiliser leur énergie. En effet ils cherchent à combler la vacance de leur orbite par appariement avec un autre électron. Ils interagissent donc avec divers composés au sein des organismes aérobies.

Ces radicaux libres ou molécules oxygénées sont dans un premier temps créés ou ingérés puis dans un second temps, on assiste à une phase de propagation qui permet la formation d'autres radicaux par réactions en chaîne :



En grande quantité, ils sont responsables de dommages cellulaires irréversibles. Ce phénomène est appelé stress oxydatif. Il résulte d'une augmentation de production de ces

radicaux (notamment par des processus endogènes telle que l'inflammation mais aussi par des processus exogènes avec une exposition importante à des sources extérieures) ou bien d'un défaut des systèmes de défense contre ces radicaux.

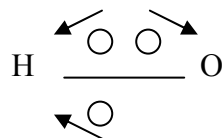
Par des mécanismes physiologiques, ces radicaux libres sont naturellement produits dans les cellules. L'équilibre entre les systèmes de production et d'élimination étant maintenu, leur concentration faible les rend inoffensifs voire même utiles dans des phénomènes tels que le renouvellement cellulaire (vasodilatation, prolifération, apoptose) ou tels que la lutte contre certains agents pathogènes (destruction de bactéries au sein des macrophages par exemple).

I.1.1.1.2. Etude biochimique

Etudions plus précisément la structure biochimique de ces radicaux libres de l'oxygène.

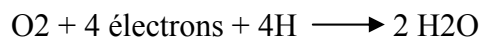
Il arrive que l'oxygène soit réduit de façon incomplète dans l'organisme et produise donc diverses substances oxygénées appelées les radicaux libres. Ils comportent alors un électron non apparié: le champ magnétique créé par sa rotation n'est pas compensé par la rotation inverse d'un autre électron.

Exemple: le radical hydroxyle HO° :



Revenons sur la structure de l'atome d'oxygène. La molécule d'oxygène, c'est à dire le dioxygène O_2 , présente dans l'atmosphère et que nous respirons, comporte deux atomes d'oxygène qui présentent chacun un seul électron sur leur orbitale la plus externe. Cependant ces électrons étant de même spin, la molécule est stable et peu réactive.

L'oxygène est normalement réduit en eau de la façon suivante par une réaction d'oxydoréduction simple pendant le processus de respiration cellulaire autrement dit la phosphorylation oxydative (25) :



Le métabolisme et la chaîne respiratoire cellulaire sont des phénomènes vitaux pour la cellule qui font intervenir une cascade de réactions que nous avons récapitulée ici sous forme de schéma (figure1):

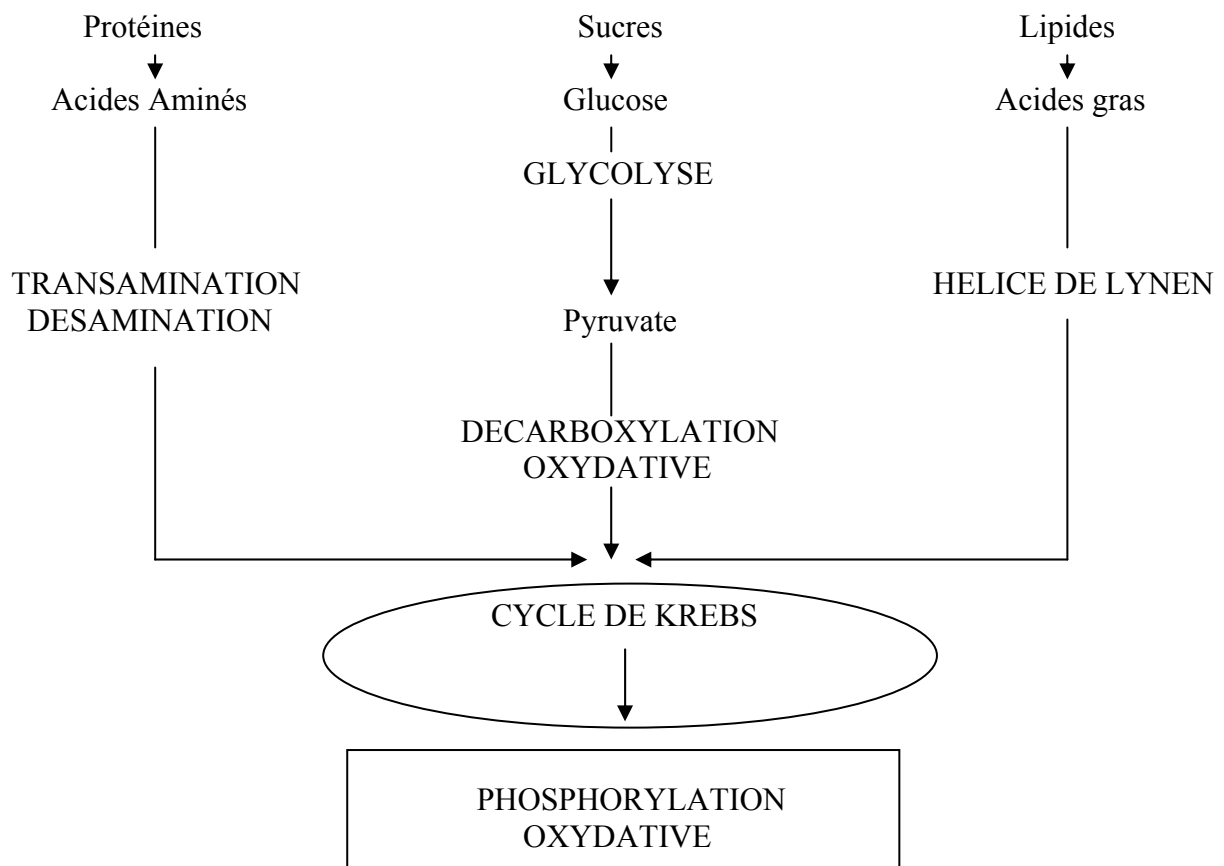


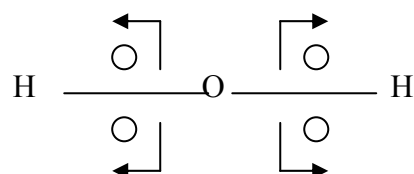
Figure 1 : Catabolisme cellulaire et production d'énergie

La chaîne respiratoire ou phosphorylation oxydative se situe au niveau de la membrane interne mitochondriale. Elle permet donc de produire la majeure partie de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP.

Le catabolisme de différentes classes de molécules produit de l'énergie contenue dans le NADH et le FADH₂.

Cette énergie va être transformée par la suite dans la mitochondrie pour donner de l'ATP (figure 2). Les coenzymes NADH et FADH₂ de la matrice vont céder leurs électrons au cours d'une cascade de réactions d'oxydoréduction qui va permettre la rencontre avec l'accepteur final : l'oxygène moléculaire et le réduire en molécule d'eau H₂O. Un flux d'électrons va donc avoir lieu au niveau de la membrane mitochondriale et créer un gradient de proton qui produit l'énergie nécessaire à l'oxydation.

Les molécules d'eau ainsi produites sont stables car ont des électrons appariés.



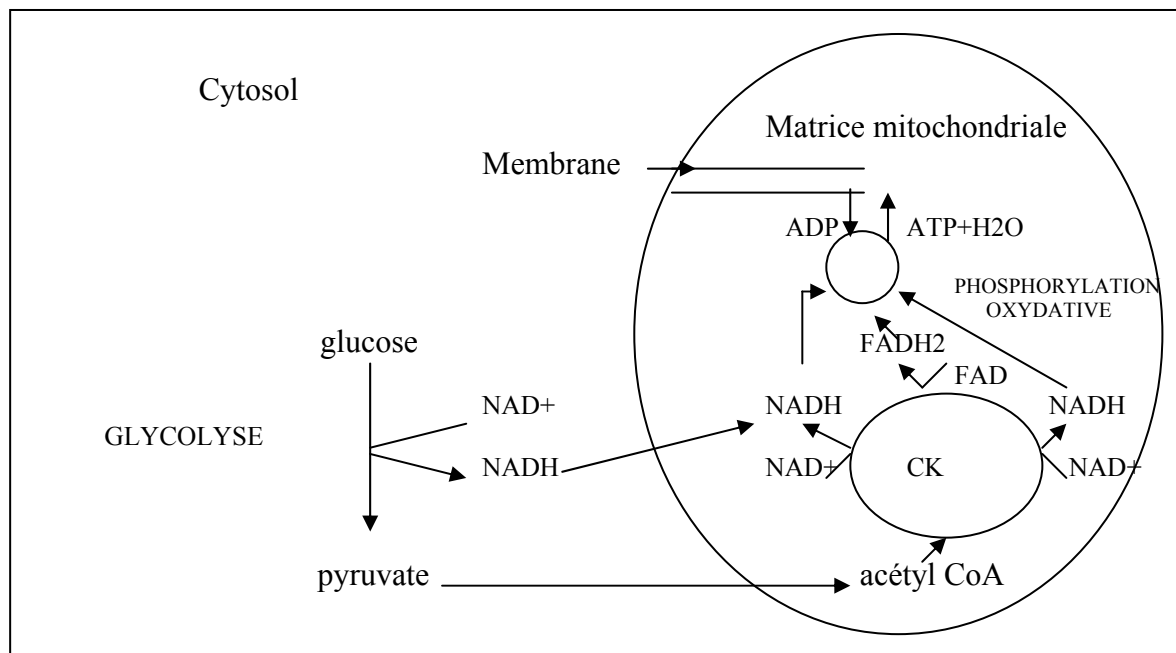
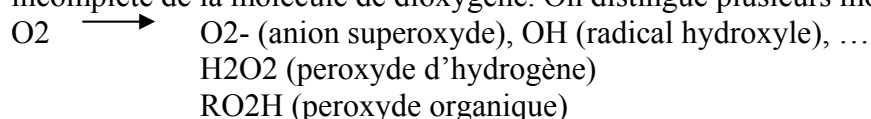


Figure 2 : Respiration cellulaire

Mais les radicaux libres de l'oxygène peuvent apparaître à partir de la réduction incomplète de la molécule de dioxygène. On distingue plusieurs molécules oxygénées (106).



Les principaux radicaux libres de l'oxygène (RLO) *sensu stricto* c'est à dire sans les formes peroxydes sont détaillés maintenant (100,109) :

- | | | | |
|---|-----------------------------|------------------|---|
| • | O ₂ ⁻ | anion superoxyde | faible action oxydative mais précurseur des autres |
| • | OH | radical hydroxyl | très réactif |
| • | NO | oxyde nitrique | formé à partir de l'arginine grâce à une réaction enzymatique activée par le Ca ²⁺ , produit par les gaz d'échappement, forme le ONOO avec le OH neuromédiateur cérébral, lutte contre les microbes, rôle vasodilatateur |
| • | ONOO | peroxynitrite | oxyde 2 acides aminés: méthionine et tyrosine |
| • | ONOOH | radical nitrosyl | donne du OH très actif |

Le radical superoxyde apparaît notamment au cours de la chaîne respiratoire mais aussi dans la chaîne de réaction appelée « voie des pentoses phosphates », lors de la synthèse de l'oxalate et de l'hème. Il peut aussi être produit lors du métabolisme de certains acides aminés, des catécholamines et des acides gras. Il va permettre surtout de générer d'autres radicaux libres de l'oxygène qui seront plus réactifs encore.

Nous allons approfondir ci-après quelques unes de ces voies.

La *phosphorylation oxydative* utilise donc de l'oxygène moléculaire. 2 à 3 % de cet oxygène mitochondrial va former le premier des radicaux libres, l'anion superoxyde O_2^- , en laissant les électrons s'échapper au cours des réactions utilisant les complexes I et III. En effet la phosphorylation oxydative fait intervenir au cours du transfert d'électrons quatre complexes protéiques utilisant le coenzyme Q et le cytochrome c comme transporteurs mobiles.

Complexe I : NADH-Coenzyme Q-oxydoréductase

Complexe II : succinate-coenzyme Q-oxydoréductase

Complexe III : coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase

Complexe IV : cytochrome c oxydase

La réduction du cytochrome c se fait par l'intermédiaire de la xanthine oxydase. Elle transforme l'hypoxanthine en acide urique en présence d' O_2 .

On peut à ce moment aboutir à la formation du radical superoxyde.

La mitochondrie produit ainsi la majorité de l' O_2^- dans la cellule.

La *voie des pentoses phosphates* est une chaîne de réactions qui produit le radical O_2^- à partir du glucose-P, du NADPH et du ribose-P. Le NADPH est utilisé dans la synthèse des acides gras et des stéroïdes et le ribose sert de précurseur à la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et de coenzymes. Cette voie se fait dans le cytosol des cellules et plus particulièrement les cellules du tissu mammaire, du tissu adipeux, du foie et du cortex surrénal.

Le substrat de cette chaîne est donc le glucose. Il l'est aussi dans la glycolyse. Selon que la cellule aie besoin d'énergie ou de synthétiser diverses molécules, elle choisira préférentiellement la glycolyse ou la voie des pentoses-P.

Dans un premier temps, on obtient du NADPH et du ribulose-P à partir du glucose qui subit différentes oxydo-réductions. La première étape, appelée segment oxydatif, est une étape irréversible de cette voie qui consomme de l'énergie et donc de l'ATP.

Dans un second temps (segment non oxydatif), le ribulose peut être soumis à des réactions d'isomérisation. Il se forme alors du ribose-P mais aussi d'autres isomères (xylulose-P). Les métabolites ainsi produits peuvent participer à la glycolyse ou la néoglucogenèse.

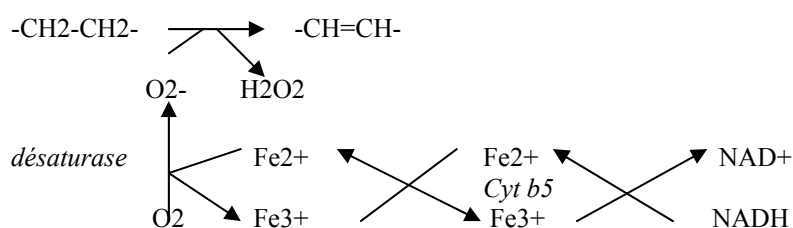
Mais si la cellule a vraiment besoin de NADPH, les réactions se poursuivent pour donner d'autres molécules (glycéraldéhyde-P et fructose -P). Le NADPH, équivalent réducteur, va permettre les biosynthèses dans la cellule, en particulier celle des acides gras.

Cette voie grâce à ses diverses réactions oxydo-réductrices peut réduire l' O_2 en O_2^- .

Le *métabolisme des acides gras* peut aussi au niveau de la mitochondrie former l'anion superoxyde. Cette réduction de l'oxygène a lieu lors de la diversification des acides gras.

En effet la biosynthèse des acides gras produit du palmityl-CoA dans le cytosol qui est ensuite allongé ou désaturé pour former les divers acides gras.

La désaturation s'effectue grâce à une enzyme, protéine de structure hémique qui utilise le NADH et le cytochrome b5 comme coenzymes. Là encore, il s'agit d'une chaîne de réactions d'oxydoréduction :



On obtient donc un anion superoxyde qui très réactif va produire du H_2O_2 en créant la double liaison de l'acide gras insaturé.

De plus les acides gras peuvent être modifiés lors de leur dégradation par rancissement c'est à dire par oxydation. Il apparaît là aussi, non seulement du O_2^- mais aussi des peroxydes.

En somme, cet anion superoxyde comporte donc un électron libre non couplé. Cet électron supplémentaire en fait une molécule instable qui réagit avec d'autres pour réduire son niveau énergétique. Ce radical est l'agent principal dans l'action bactéricide des phagocytes. Mais beaucoup de radicaux libres sont en fait des sous-produits de cet anion, et certains sont beaucoup plus instables et donc plus nocifs que l' O_2^- .

Cette molécule peut ainsi produire le radical hydroxyle et de l'oxygène singulet. Le radical hydroxyle est formé suite à la réduction de H_2O_2 par les ions ferriques et cuivriques eux mêmes réduits par O_2^- . Il est fortement réactif et va provoquer de nombreux dégâts.

L'oxygène singulet, très instable aussi, est lui formé spontanément par l'interaction entre le H_2O_2 et le radical superoxyde. Il comporte un seul atome d'oxygène avec deux électrons de même spin sur la même orbitale. Sa réactivité est très importante mais sa durée de vie limitée.

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les mêmes voies que O_2^- et est un produit de dégradation du radical superoxyde par une enzyme appelée superoxyde dismutase SOD dont nous verrons l'utilité ultérieurement.

Il apparaît notamment au cours du catabolisme des monoamines (comprenant par exemple des neurotransmetteurs comme la dopamine ou la sérotonine). Ce processus a lieu sur la membrane externe de la mitochondrie et fait intervenir des enzymes entraînant une désamination oxydative. L' O_2 moléculaire est alors réduit en H_2O_2 .

Quant aux peroxydes organiques, ils apparaissent au cours de la synthèse des prostaglandines, des prostacyclines, des thromboxanes et des leucotriènes.

La *synthèse de ces composés dérivés l'acide arachidonique* se fait en plusieurs étapes qui laissent apparaître des hydroperoxydes instables.

L'arachidonate lui-même issu de l'acide linoléique, va donner des prostaglandines PGH 1 et PGH 2 par ajout entre autres d'une fonction hydroperoxyde en C15 sous l'action de la cyclo-oxygénase. L'eicosapenténoate, issu de l'acide linoléique, subit les mêmes réactions pour donner des PGH 3 (PGH 1,2 et 3 sont donc des peroxydes de type ROOH).

Ce sont des composés instables, dont le plus fréquent est la PGH 2. On obtient ensuite la PGG 2 (ROOH donne ROH). Ces synthèses ont lieu dans les cellules endothéliales, mésangiales ou endocriniennes du système nerveux ou du foie.

La PGG2 est à l'origine de PGE 2, PGA 2 et PGF 2 dans le même type de cellules mais produit aussi après formation d'un hétérocycle les prostacyclines (PGI 2) et les thromboxanes (TxA 2) dans les cellules mésangiales, endothéliales et les plaquettes.

Une réaction d'oxygénation peut aussi avoir lieu sur le C5 de la chaîne arachidonique et donner un hydroperoxyde par l'action de la lipo-oxygénase : 5 HPETE, composé initial de tous les leucotriènes. Ces leucotriènes, eux, sont synthétisés par les neutrophiles.

Chez le chat, l'absence d'une enzyme désaturase ne permet pas de transformer l'acide linoléique en arachidonate. C'est pourquoi l'alimentation féline inclut toujours de l'acide arachidonique.

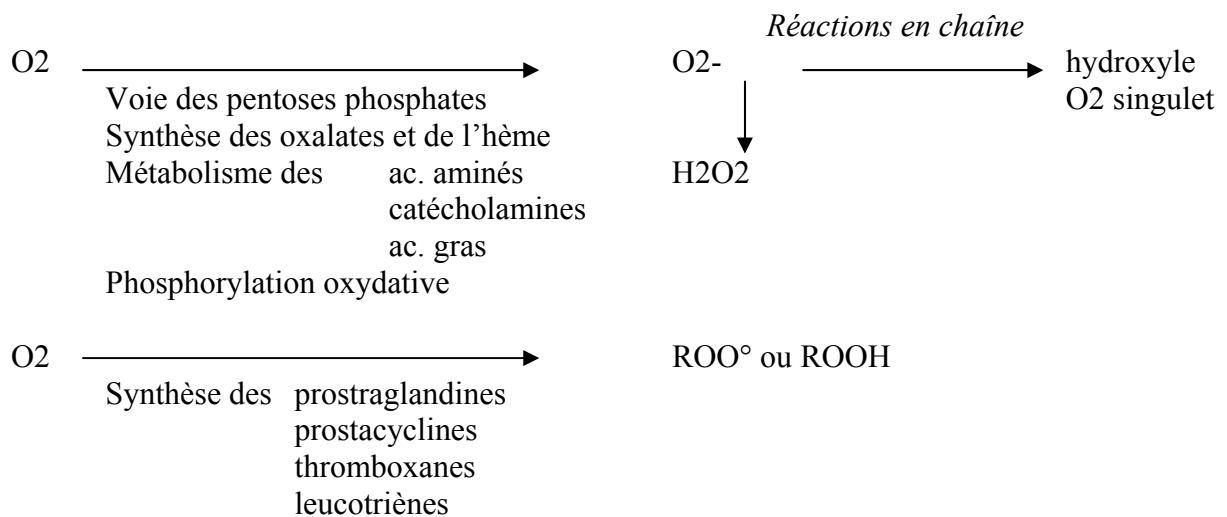
L'instabilité de ces substances explique leur catabolisme rapide et leur rôle surtout local. Elles interviennent donc comme médiateur chimique et permettent essentiellement les réactions inflammatoires. Leurs actions principales visent la vasoperméabilité, la tonicité des muscles lisses et la coagulation sanguine. Il est néanmoins intéressant de situer ces réactions qui, en excès, expliquent la fragilité de certaines cellules et de certains tissus.

I.1.1.2. Formation et facteurs de risques

Les radicaux libres sont en majorité produits de façon interne par l'organisme mais dans une moindre mesure, on a constaté qu'ils peuvent aussi provenir d'une source externe.

I.1.1.2.1. Endogènes

Les voies de formation de ces composés oxygénés dans l'organisme sont diverses et résumées ici :



I.1.1.2.2. Exogènes

Il apparaît que les radicaux libres sont aussi présents dans l'environnement et que certains éléments augmentent notablement le risque de stress oxydatif de nos cellules.

Les sources d'exposition sont variables mais on peut en distinguer quelques unes assez fréquentes :

- les fumées de combustion et la pollution, notamment la fumée de cigarette mais aussi celles du bois et de matériaux de construction.
- les radiations
- les rayons ultraviolets et les rayons X
- certains produits chimiques tels que des médicaments, par exemple l'adriamycine utilisée aussi en médecine vétérinaire dans des protocoles de chimiothérapie mais aussi des antibiotiques comme le métronidazole, des pesticides ou des solvants.
- on peut aussi mettre en cause certaines poussières ou résidus et c'est le cas de l'amiante et de la silice.

Ces facteurs augmentent le métabolisme anormal mitochondrial et ainsi la production de radicaux libres dans l'organisme.

Par conséquent, on comprend que le stress oxydatif peut varier d'un individu à l'autre en fonction de son exposition à diverses sources (4).

Un individu sera donc plus exposé s'il cumule les sources ou bien si l'intensité (durée ou concentration) d'une ou des sources est importante.

Mais la gravité de l'exposition dépend aussi de la capacité de l'organisme à les combattre, ainsi un sujet sera potentiellement plus exposé s'il est :

- malade : maladie chronique (21,36), défaut d'immunité
- affaibli : exercice intense et prolongé (65), anesthésie (8,67)
- obèse (22).

De même le risque va dépendre étroitement de ses habitudes alimentaires. En effet deux facteurs principaux interviennent. D'une part les systèmes de lutte contre ces radicaux libres, notamment l'apport en antioxydants par la nourriture, peuvent diminuer ce risque et d'autre part la qualité et la quantité d'acides gras poly insaturés absorbés (peroxydes alimentaires absorbés ou composition lipidique inadéquate) peuvent conduire à la présence de radicaux libres dans l'organisme de façon non négligeable.

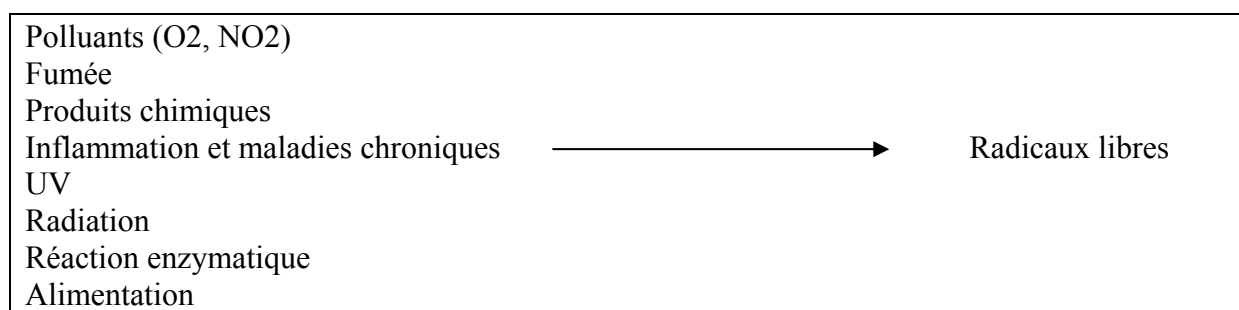


Figure 3 : Facteurs de risques du stress oxydatif

Ces facteurs sont donc assez variés comme le montre la figure 3, et les sources d'exposition de plus en plus fréquentes dans notre société. Ils sont tous responsables de l'augmentation de la production des composés oxygénés dans l'organisme.

I.1.2. Conséquences

Les conséquences de ces composés oxygénés instables sur les individus (hommes ou animaux de compagnie) se constatent à plusieurs échelles. Ils sont responsables de dégâts moléculaires, cellulaires et enfin organiques. De nombreuses affections semblent impliquées les radicaux libres. Ces composés sont d'ailleurs aujourd'hui encore très étudiés et ont un rôle de plus en plus prépondérant dans le mécanisme de diverses maladies. Même s'il reste encore des facteurs inconnus ou des difficultés à les quantifier, l'objectif des nombreuses recherches est de prévenir ou de neutraliser leurs effets délétères.

I.1.2.1. Conséquences biologiques

Ces radicaux libres instables sont à l'origine de dommages in vivo importants. On peut différencier en particulier trois principaux types d'actions de ces composés sur les autres molécules de l'organisme :

- ils vont participer à la peroxydation des lipides, et donc créer des anomalies dans la structure des membranes cellulaires ;
- ils vont aussi dénaturer les acides aminés, et donc provoquer la déstabilisation de nombreuses protéines ;
- et enfin ils vont abîmer les bases azotées, constituant essentiel de l'ADN et donc provoquer des aberrations génétiques.

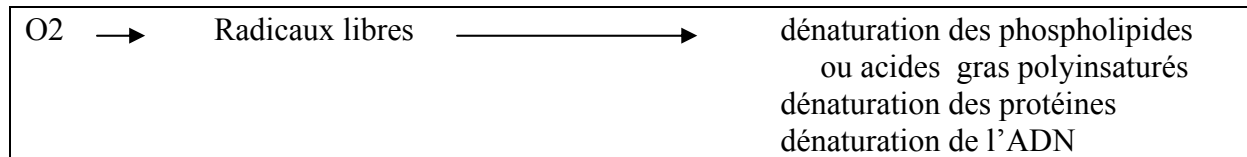


Figure 4 : Action des RLO au niveau moléculaire

De plus, une fois qu'une interaction donc une dénaturation a eu lieu, il s'en suit une cascade de réaction produisant des composés eux-mêmes instables. Ces altérations sont à l'origine de dégâts à l'échelle de la cellule.

Nous pouvons visualiser ces phénomènes grâce à la figure suivante :

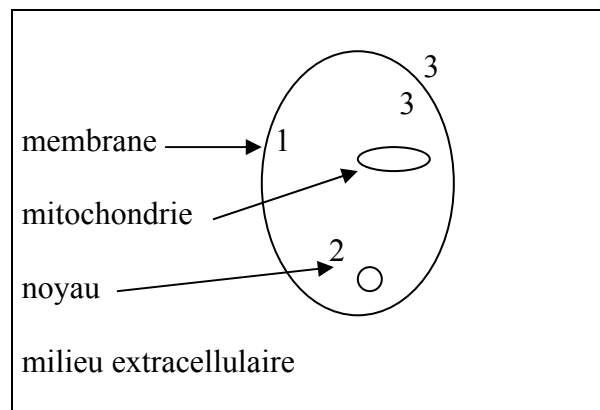


Figure 5 : Action des RLO au niveau cellulaire

- 1/ la membrane cellulaire est constituée d'acides gras polyinsaturés, qui vont subir la peroxydation par les radicaux libres.
- 2/ le noyau (et la mitochondrie) possède de l'ADN, siège de mutations par les radicaux libres.
- 3/ à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule, les protéines présents peuvent être inactivées par ces radicaux libres.

Ces dommages épars conduisent à une perte de fonction voire à la mort de la cellule.

I.1.2.1.1. Peroxydation des lipides

Les molécules oxygénées instables cherchent à combler la vacance de leur orbite et donc vont pouvoir réagir avec les lipides constitués d'acides gras poly insaturés. Il s'agit probablement de la réaction chimique délétère la plus connue des RLO.

Les membranes cellulaires composées de ces phospholipides sensibles vont donc se désorganiser et vont permettre la libération de certaines molécules type pentane et aldéhyde qui y sont normalement imbriquées. Ces molécules en quantité importante sont extrêmement toxiques pour la cellule et peuvent conduire à sa mort. C'est particulièrement le cas des cellules neuronales riches en composés lipidiques tels que la myéline.

Cette réaction provoque aussi la dissociation des lipoprotéines à faible densité du sang et provoque un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins.

Ces lipides oxydés peuvent aussi générer des composés carcinogènes très néfastes pour l'organisme.

I.1.2.1.2. Dénaturation des protéines

Les radicaux libres sont à l'origine d'une réaction qui entraîne la dénaturation des acides aminés. Cette dégradation provoque la modification des structures des protéines et notamment des structures secondaires et tertiaires. Il y a souvent formation d'une liaison disulfure lors des réactions d'oxydation.

Il peut alors apparaître une modification de la structure cellulaire mais aussi une perte d'activité enzymatique de certaines protéines directement liée à leur structure dans l'espace et un dysfonctionnement des signaux de défense ou de prolifération.

I.1.2.1.3. Dénaturation de l'ADN

En réagissant avec les acides nucléiques, les radicaux libres provoquent des erreurs ou bien un arrêt dans le génome de la cellule; par conséquent la lecture génétique du noyau est faussée et crée des aberrations (68). Les mutations de l'ADN peuvent avoir lieu au niveau nucléaire mais aussi au niveau mitochondrial (34). Les acides désoxyribonucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux hydroxyles.

Cette oxydation peut provoquer la mort de la cellule et ces mutations semblent pouvoir expliquer le processus cancérigène de différents organes (71).

L'ADN mitochondrial (79) est encore plus sensible aux attaques des RLO que l'ADN nucléaire car il ne possède pas de transcriptase reverse et n'est pas complexé avec des histones. Il peut donc subir des mutations suite aux attaques des RLO. Ainsi la phosphorylation oxydative subit des perturbations et l'énergie mitochondriale devient moins disponible. Les tissus les plus dépendants de cette énergie sont alors fragilisés. Nous pouvons citer en exemple le système nerveux central, l'œil, l'oreille, le cœur, le foie, le rein, le pancréas, les muscles squelettiques qui peuvent être à l'origine respectivement des maladies d'Alzheimer ou parkinson, d'atrophie optique, de surdité, de cardiomyopathie, de désordre hépatocellulaire, de tubulopathie, de diabète, de myopathie. Il est à noter que toutes les maladies mitochondriales ne sont pas dues à des mutations génétiques mitochondriales, elles peuvent aussi apparaître suite à des mutations sur l'ADN nucléaires ou bien à un défaut de structure protéique déclenchées ou non par des radicaux oxydants.

I.1.2.2. Affections associées

D'un point de vue général, les dommages cellulaires créés par ces molécules oxydantes sont à l'origine ou participent à des maladies (33) et des symptômes particuliers pour l'organisme. Ces maladies peuvent être purement une conséquence génétique des RLO, mais peuvent aussi dépendre de l'environnement (intoxication, HIV,...) ou bien peuvent dépendre d'une association de ces deux facteurs (diabète, asthme,...).

Les cellules si elles sont endommagées en proportion importante peuvent cr  er des lésions au niveau de l'organe. Il semble acquis qu'une très forte concentration de radicaux libres de façon très localisée puisse être à l'origine d'un processus à minima inflammatoire voire nécrotique des tissus. De la même façon, une concentration modérément élevée mais agissant de façon continue semble favoriser un processus de cancérisation des tissus.

Plus largement, les études semblent incriminer les radicaux libres dans le vieillissement des cellules et de l'organisme.

Les radicaux libres et le stress oxydatif engendré peuvent donc être :

- la cause primaire d'une maladie (sclérose latérale amyotrophique, cancer, cataracte) soit par l'apparition de molécules anormales soit en surexprimant certains gènes,
- favoriser le déclenchement d'une maladie polyfactorielle (diabète, Alzheimer, maladies vasculaires, maladie de Crohn,...),
- ou bien peuvent compliquer une maladie initialement provoquée par un tout autre facteur (le virus du HIV induit un stress oxydatif qui provoque la mort de lymphocytes T, essentiel dans le combat contre la maladie) .

Nous allons citer ici quelques-unes de ces conséquences :

- Cancer :

On peut, après les constatations précédentes et selon différents auteurs, suspecter les radicaux libres d'intervenir dans des processus tels que les cancers (68,92) . En effet les dégâts créés sur l'ADN peuvent être à l'origine du développement de certains cancers, en amplifiant les signaux de prolifération et en inhibant les antioncogènes.

Certains organes seraient particulièrement sensibles, notamment le sein et le foie (Cf. localisation de la voie des pentoses).

- Athérosclérose et maladie cardiovasculaire (2,32,83,86):

La peroxydation des lipides par ces composés instables (notamment les produits issus de l'oxydation du cholestérol : malonaldehyde) peut contribuer sensiblement à la pathologie de l'athérosclérose. On va avoir apparaître des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux. Le cholestérol transporté par les LDL oxydés est reconnu par des récepteurs qui font passer les lipides du sang vers des cellules type macrophages, endothélium, lymphocytes. Puis ces cellules dégénèrent et il se forme alors ce dépôt sur les parois des vaisseaux.

Les peroxydes et radicaux libres vont aussi interagir directement avec les constituants de l'intima et les détériorer, l'intima étant une couche de la paroi des artères du corps. Les radicaux libres sont impliqués dans les phénomènes d'hypertension et peuvent provoquer des dégâts au sein même du cœur tel l'infarctus.

- Diabète :

L'augmentation des radicaux libres dans l'organisme provoque pour la même raison (peroxydation des lipides) et par accumulation du malondialdehyde, une augmentation de la glycosylation des protéines, qui est une complication majeure de l'hyperglycémie présente avec le diabète (21,88). Ils interviennent comme un facteur non négligeable en causant une augmentation de la résistance à l'insuline chez les individus.

On peut signaler ici que l'obésité est un facteur prédisposant au diabète et que l'obésité crée un stress oxydatif supplémentaire.

- Dégénérescence nerveuse :

En cas de troubles neurodégénératifs, les radicaux libres sont en plus grande quantité et sont susceptibles de provoquer la mort des neurones. Ils sont fortement étudiés dans le mécanisme de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (1,66,107) chez l'homme. Les publications concernant la maladie de Parkinson montrent que la glutathion peroxydase et les autres mécanismes de défenses sont réduits, la concentration en fer augmentée et la peroxydation lipidique augmentée.

Chez le chien, les RL créent des lésions cellulaires similaires, on parle alors de troubles de désorientation, de modification des relations, de trouble du sommeil,...

En effet, le tissu nerveux est très riche en lipides et en mitochondries ce qui le rend extrêmement sensible à la peroxydation.

En outre, on peut rappeler le rôle particulier du NO ou ONOO sur les motoneurones, du OH, et du NO et O₂⁻ qui interagissent sous la présence d'acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate) dans la sclérose latérale amyotrophique.

- Cataracte :

La lumière et l'oxygène sont nécessaires au bon fonctionnement de l'œil. Cependant en excès, ils favorisent le développement de la cataracte (93). Ces facteurs extérieurs provoquent une production excessive de radicaux libres dans les structures oculaires et de plus avec l'âge, on voit apparaître une diminution des systèmes de contrôle et de réparation.

- Asthme :

Chez des patients asthmatiques, on a montré des quantités plus importantes de radicaux libres dans leurs cellules pulmonaires. Des études in vitro ont montré que la présence de ces radicaux permettent dans des cellules ou organismes sains de reproduire de nombreuses caractéristiques inflammatoires de l'asthme (84). Plus largement ces substances réagissant à l'oxygène interviennent dans la pathogénie d'autres maladies respiratoires comme l'œdème pulmonaire et le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte.

- Affections rénales et urinaires :

En abîmant les cellules urinaires, les molécules oxydantes sont un facteur favorisant au développement des cristaux urinaires d'oxalates (37). De plus par les lésions vasculaires notamment glomérulaires (77) et tubulaires, elles jouent aussi un rôle prépondérant dans les affections rénales et particulièrement dans le processus inflammatoire (oxydation des protéines) lié à l'insuffisance rénale chronique (26). L'altération de l'ADN des lymphocytes chez des sujets insuffisants rénaux est diminuée lors d'une supplémentation en antioxydants..

- Affections gastro-intestinales :

Lors d'inflammation des muqueuses gastro-intestinales, les lésions tissulaires liées à la quantité excessive de radicaux libres présents sont significatives (53). Les radicaux et les peroxydes semblent donc responsables d'affections aiguës telles que des entérites et des colites souvent ulcérales, mais aussi de phénomènes plus chroniques comme les cancers de l'intestin et du colon, les hépatites et pancréatites.

- Système immunitaire :

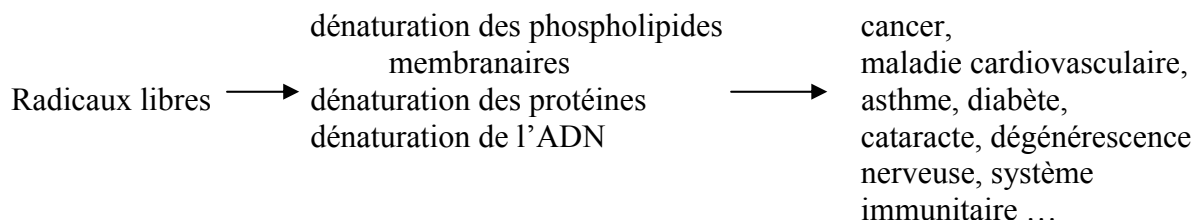
Ces peroxydes provoquent une baisse de l'immunité en abîmant les cellules intervenant normalement dans la défense de l'organisme (58), par exemple la destruction de lymphocytes T (3), facteur essentiel en cas d'infection par le virus du SIDA. Dans ce cas, on a pu constater que les gènes des superoxydes dismutases et des glutathion peroxydases étaient réprimés. De plus les oxyradicaux affectent des médiateurs de l'immunité comme les cytokines permettant la communication entre les cellules.

- Anémie de Fanconi :

Cette maladie est directement liée aux perturbations génétiques, qui altèrent les érythrocytes.

A cette liste, on peut ajouter d'autres troubles qui touchent par l'exemple la peau (dermatite atopique, cancer) mais aussi les articulations (arthrites, rhumatismes).

En résumé, les effets des radicaux libres sont divers et encore mal connus. L'association entre lésions oxydatives et maladies cliniques est désormais bien documentée mais on ne sait pas encore établir à partir de quel moment ces altérations deviennent la cause de ces maladies ou les font évoluer. La plupart des preuves sont indirectes : elles montrent qu'un déficit en antioxydants va de pair avec une augmentation du stress oxydatif et une aggravation de la maladie.



Il semble donc acquis, par la nature même des interactions des RLO avec les divers constituants de l'organisme, que de nombreux organes peuvent être atteints.

On peut en visualiser quelques-uns sur la figure 6 (69) :

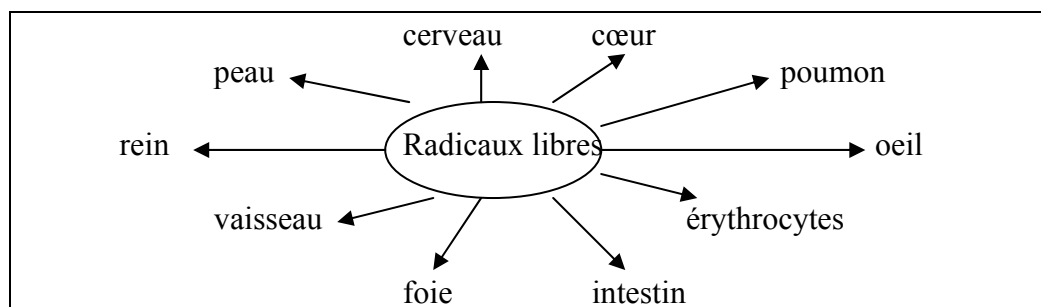


Figure 6 : Action des RLO au niveau de l'organisme

Ces maladies ont été surtout décrites chez l'homme mais certaines sont de plus en plus étudiées chez le chien et le chat (38,45,46,67). Ainsi on a surtout prouvé le rôle du stress oxydatif dans le diabète, l'insuffisance rénale chronique et l'asthme (pris dans le panel des maladies similaires chez l'homme). Chez le chat, ces pathologies (souvent proches de celles de l'homme) incluant une augmentation des RLO et une diminution des défenses antioxydantes ont montré l'intérêt de combattre ce stress oxydatif en stimulant les systèmes antioxydants de l'organisme. Grâce à la diététique chez le chien et le chat, on peut constater une nette amélioration dans la lutte contre les lésions oxydatives.

La supplémentation en antioxydants permet de favoriser la réponse immunitaire chez de jeunes chiots ou au contraire chez de vieux individus, plus touchés que les adultes par diverses maladies infectieuses (exemple du parvovirus) (27), et permet plus largement de retarder ou ralentir le développement de nombreuses maladies.

Les effets des RLO sont donc à prendre sérieusement en considération et à combattre. Cela implique l'augmentation du système de défense des organismes et s'applique d'une manière préventive pour des organismes adultes sains ou parfois atteints de maladies chroniques, et d'une manière encore plus obligatoire pour les organismes fragilisés ou malades.

I.1.2.3. Théorie du vieillissement

Les individus et notamment les chiens qui vieillissent voient leur organisme s'affaiblir. En général, cette tranche d'âge de la population est caractérisée par l'apparition fréquente et simultanée d'un certain nombre de troubles.

Cette théorie a été décrite pour la première fois en 1956. Elle résulte donc de l'augmentation des radicaux libres présents dans les organismes et de leurs effets néfastes au moment du vieillissement. Tous les dommages subis sont en partie responsables de nombreuses maladies qui apparaissent de façon fréquente avec l'âge et le vieillissement telles que l'arthrite, la cataracte, le diabète et la diminution de la réponse immunitaire. Elles sont donc regroupées dans un même ensemble et impliquent une même cause : les radicaux libres (42,80).

Elle a été étudiée chez les hommes et les femmes, ainsi que chez certains animaux de laboratoires mais elle est maintenant mise en avant pour nos animaux de compagnie et notamment le chien et le chat par de nombreuses expérimentations (12,23,48,62,78).

Lors du vieillissement, la capacité de l'organisme à répondre aux dommages oxydatifs diminue. En effet, notamment chez le vieux chien, les lésions dues aux RLO interviennent dans des maladies liées à l'âge, en particulier le cancer, la dégénérescence nerveuse, le diabète (5,24) et la cataracte. L'apparition et la présence de troubles cognitifs chez l'animal âgé permet d'estimer avec précision les lésions cellulaires dues aux RL. Mais il semble que les changements liés à l'âge provoquent surtout une diminution de la réponse immunitaire associée à des altérations des constituants organiques car on assiste à une accumulation des RL (38).

Plusieurs autres paramètres ont été mis en cause dans l'étude du vieillissement (perte de la masse musculaire au profit des masses graisseuses, défaut du contrôle génétique, perte de l'homéostasie de certains systèmes physiologiques : immunitaire, neurologique, etc...).

Le plus probable est qu'une association de ceux-ci y compris les dommages dus aux RLO explique le processus de vieillissement. Dans tous les cas, nombre de ces hypothèses montrent l'intérêt d'une alimentation adaptée qui ralentit en particulier la baisse immunitaire et combat le stress oxydatif (45,48,49,57,73,81) .

En conclusion, les composés oxydés interviennent réellement dans le processus de vieillissement et notamment au cours de la dégénérescence cérébrale mais on sait maintenant qu'ils sont également impliqués dans des affections chroniques à d'autres stades de la vie.

I.1.3. Systèmes de lutte

Les radicaux libres de l'oxygène sont naturellement produits par l'organisme mais celui-ci a la capacité de mettre en place des systèmes de défenses. Il entretient donc une concentration faible des composés instables grâce à une production contrôlée et une élimination efficace, phénomène appelée balance antioxydante (7,41).

En cas de stress oxydatif, ils peuvent créer des dommages importants si la production est accentuée (notamment sous l'effet de facteurs externes) mais également si la réparation ou l'élimination n'est pas suffisante ou défectueuse.

Les différents procédés pour limiter la quantité de RLO vont être explicités maintenant.

I.1.3.1. Mécanismes

On distingue essentiellement trois types de systèmes de lutte antioxydante (40,109) : un système préventif qui empêche une production trop importante de RLO, un système capital actif qui répond à un stress oxydatif mais aussi un système passif moins efficace qui ne fonctionne qu'après une forte surcharge de RLO en détoxifiant l'organisme lorsque les deux précédents s'avèrent insuffisants (56).

D'autres composés servent à la défense contre les RLO en agissant plus indirectement, nous verrons ainsi les précurseurs de ces systèmes et les réparateurs éventuels (69).

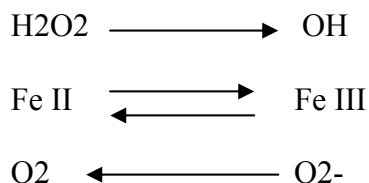
I.1.3.1.1. Système préventif

L'organisme agit en amont, c'est à dire qu'il met en place un système visant à inactiver les molécules capables de produire ces radicaux libres. Il s'agit d'un système préventif continu qui ne répond pas plus fortement en cas de stress oxydatif mais évite donc les réactions en chaîne aboutissant aux dommages cellulaires.

Ce mécanisme inactive donc des molécules pouvant être responsables de la formation de radicaux. C'est le cas notamment :

- pour les molécules servant au transport des électrons vers l'accepteur final (flavines, quinones, sulfo-ferroprotéines...) et produisant le radical superoxyde instable.
- mais aussi du fer divalent et du cuivre monovalent.

En effet, ces métaux sous leur forme libre peuvent générer des radicaux hydroxyl très réactifs à partir de peroxyde d'hydrogène moins réactif. Dans le cas du fer, on parle de réaction de Fenton :



Pour illustrer ce propos, les particules d'amiante sont source de radicaux libres car leur surface est tapissée de fer adsorbé (59). De plus, le relargage du fer se ferait en partie par la ferritine sous l'action de mécanismes déclenchés par l'adriamycine par exemple.

Pour limiter le nombre de ces molécules, le système préventif utilise :

- des enzymes telles que la DT-diaphorase qui maintiennent les quinones ou les métaux à l'état réduit
- et des protéines chélatrices du fer telles que la ferritine, la transferrine ou l'hémosidérine (18) et du cuivre telles que l'albumine ou la métallothionéine.

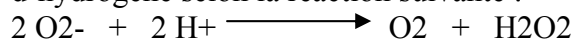
En fait, l'organisme dispose d'un système de régulation génétique oxydatif nommé « iron switch ». Il active les gènes responsables de la production de la ferritine qui va stocker le fer en excès et inhibe les gènes codant pour le récepteur de la transferrine pour éviter l'entrée de fer dans la cellule.

Dans la cellule, l'hème oxygénase est capable de détruire l'hème libre pouvant produire le radical hydroxyl (en effet le fer sous forme réduite anormale peut aussi produire des RLO). Il s'agit d'un autre système adaptatif.

I.1.3.1.2. Système actif

Dans un second temps, nous allons voir comment il est possible de transformer ces radicaux libres en molécules non toxiques lorsqu'ils apparaissent de manière excessive suite à un stress oxydatif. L'organisme dispose pour cela d'un mécanisme antioxydant constitué d'enzymes capitales : les superoxydes dismutases (SOD), la catalase et les glutathion-peroxydases.

Les *superoxydes dismutases* (96) transforment les anions superoxydes en peroxydes d'hydrogène selon la réaction suivante :



Ces enzymes permettent donc de détruire les radicaux superoxydes et ainsi d'éviter l'apparition et l'augmentation de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet beaucoup plus réactifs. Outre une possible propriété de stockage du cuivre, leur activité enzymatique et catalytique a été mise en évidence en 1969.

Elles utilisent 2 radicaux superoxydes et 2 atomes d'hydrogènes pour donner un peroxyde d'hydrogène et une molécule d'oxygène stable. Il s'agit de réactions d'oxydoréduction possibles grâce à leurs cofacteurs métalliques (47,51).

Il existe différentes classes de SOD mais le principe de la réaction reste identique (35).

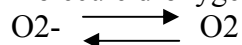
En général chez les mammifères, on cite fréquemment 2 SOD à cuivre et à zinc qui agissent si la réaction a lieu dans le cytosol intracellulaire ou dans le milieu extracellulaire et une SOD à manganèse intervenant si elle a lieu dans les mitochondries.

Ce sont donc ces éléments métalliques qui permettent la catalyse de la réaction. En effet l'ion métallique de ces enzymes permet de transférer l'électron excédent de l'anion superoxyde au peroxyde d'hydrogène. Ainsi le cuivre et le manganèse permettent ce mécanisme catalytique.

Il est à noter que l'élément zinc est tout de même indispensable dans la structure de la Cu-Zn SOD et que sans cet élément elle ne pourrait être active.

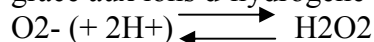
La Cu-Zn SOD est plus efficace que les autres classes de SOD car elle présente une zone chargée positivement dans son organisation spatiale qui attire de façon plus efficace le radical superoxyde et son électron vers l'ion cuivrique.

Dans le détail, un radical superoxyde O_2^- va tout d'abord rencontrer l'enzyme et provoquer la réduction de l'ion métallique ($\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}$ ou $\text{Mn}^+ \rightarrow \text{Mn}$) ainsi que la formation d'une molécule d'oxygène.



Ce couple a donc un potentiel redox et la molécule superoxyde a ici un rôle réducteur.

L'ion une fois réduit va rencontrer dans un second temps l'autre radical O_2^- et oxyder cet ion grâce aux ions d'hydrogène et va former une molécule de peroxyde d'hydrogène.



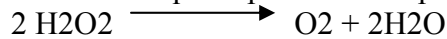
Ce couple a lui aussi un potentiel redox et ici le radical libre a un rôle d'oxydant.

Ce dernier élément ainsi produit comme nous l'avons expliqué précédemment, est lui aussi un composé instable de l'oxygène. Mais le peroxyde d'hydrogène est ensuite pris en charge par une autre enzyme la *catalase* :

On trouve cette enzyme hémique à activité peroxydasique dans les peroxysomes des hématies (14,15), des hépatocytes et des cellules rénales et dans les microperoxysomes des autres tissus.

Toutes les peroxydases de ce type utilisent le H₂O₂ comme oxydant. De plus la catalase a comme substrat à oxyder ce même H₂O₂.

La réaction qui se produit alors peut donc se schématiser ainsi :



A partir du radical superoxyde et grâce à ces 2 enzymes, on obtient donc des molécules d'oxygène et d'eau non toxiques pour l'organisme.

La SOD agit aussi sur le peroxynitrite ONOO en créant un nitronium qui nitrate les résidus tyrosine. Or de nombreux facteurs trophiques agissent sur les récepteurs tyrosine-like présents sur les motoneurones. C'est un élément essentiel de la dégénérescence nerveuse apparaissant lors de la maladie de la sclérose latérale amyotrophique.

En revanche, une augmentation de la SOD peut aussi être à l'origine de dommages tissulaires. En effet on assiste à une surproduction de H₂O₂ qui aboutit à un excès de OH en présence de fer (réaction de Fenton). Dans la SLA, on ne sait pas si la mutation génétique conduit à une sous ou surproduction de SOD.

En outre l'organisme est détoxifié de ces peroxydes par des enzymes à activité *glutathion-peroxydase*. Elles agissent non seulement sur les peroxydes d'hydrogène mais aussi sur les peroxydes organiques (75).

On peut distinguer 2 types d'enzymes :

- la glutathion peroxydase sélénium-dépendante
- les isoenzymes des glutathion-S-transférases.

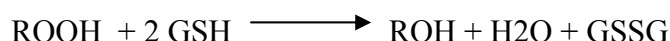
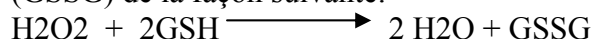
Le premier type agit sous 2 formes. Sa forme hydrosoluble agit dans le cytosol, la matrice mitochondriale, le plasma (13) et elle s'attaque aussi bien aux 2 types de peroxydes (H₂O₂ et ROOH). Sa forme lipophile se trouve dans les membranes des mitochondries, des noyaux et du reticulum endoplasmique, elle est spécifique des phospholipides.

Une isoenzyme existe aussi et semble spécifique des cellules digestives.

Dans les 2 cas cette enzyme nécessite impérativement la présence de sélénium (Se) pour fonctionner (63).

Le second type se trouve surtout dans le cytosol des cellules et semble très actif au niveau du foie et des poumons. Elle n'agit que sur les hydroperoxydes organiques. La réaction ici n'est pas catalysée par le Se mais nécessite des substances comme l'hydroperoxyde de cumène.

La transformation des peroxydes se fait grâce à l'oxydation du glutathion (GSH) en bisulfure (GSSG) de la façon suivante:



Le GSSG formé peut être réduit grâce à l'enzyme glutathion-réductase. Cette enzyme a besoin de NADPH qui se transforme alors en NADP⁺. Ce dernier composé peut lui aussi être réduit et redonner du NADPH grâce à l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (figure 7). Ces molécules sont notamment des intermédiaires importants de la voie des pentoses

phosphates précédemment décrite. Cette voie permet donc, en plus de la production des molécules délétères, de produire des molécules de lutte selon l'intensité du stress oxydatif.

Le mécanisme d'action de la glutathion peroxydase (GPx) est illustré plus précisément maintenant :

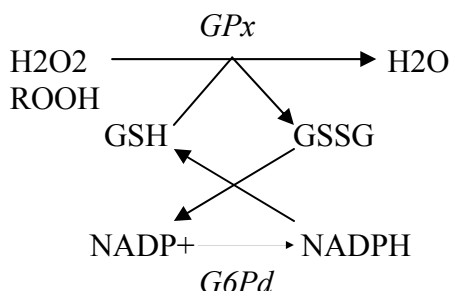


Figure 7 : Action de la glutathion peroxydase

Le peroxyde d'hydrogène est donc pris en charge soit par la catalase soit par la glutathion-peroxydase Se-dépendante (figure 8). Cela va dépendre de la localisation de la réaction et de la disponibilité dans la cellule du GSH (glutathion), du NADPH et des deux enzymes en question.

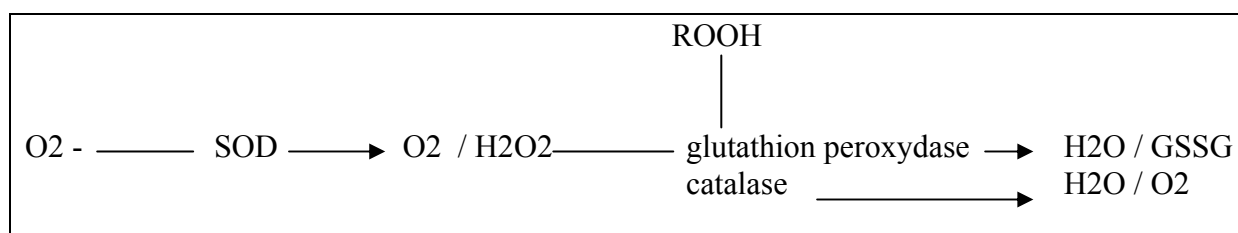


Figure 8 : Action de la Glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase

L'organisme présente donc une activité qui vise à lutter contre la formation exagérée des radicaux libres. Il utilise des protéines enzymatiques « antioxydantes » et des agents « oxydables » divers. Ces réactions aboutissent à la production de molécule d'eau, d'oxygène et de GSSG stables et non toxiques.

En dehors de ces enzymes antioxydantes, il existe *d'autres protéines* agissant à divers niveaux des réactions en chaîne.

On peut notamment citer la thioredoxine réductase qui régénère la thioredoxine utilisée par la thioredoxine peroxydase et les enzymes capables de réduire les ponts disulfure des protéines.

On peut aussi évoquer la sélénoprotéine P capable de détruire le peroxynitrite produit par les macrophages ou les neurones (9).

Hormis des protéines, ce système de lutte comprend aussi le zinc qui possède une activité antioxydante non négligeable. Il va surtout protéger les protéines de l'oxydation en prenant la place du fer dans les structures hémiques. Le fer peut en effet produire des radicaux libres lorsqu'il est sous forme réduite dans des hémoprotéines comme la méthémoglobine.

En somme ce système de protection est relativement riche et complexe. Il est résumé dans la figure suivante issue du travail du Pr. Favier (103).

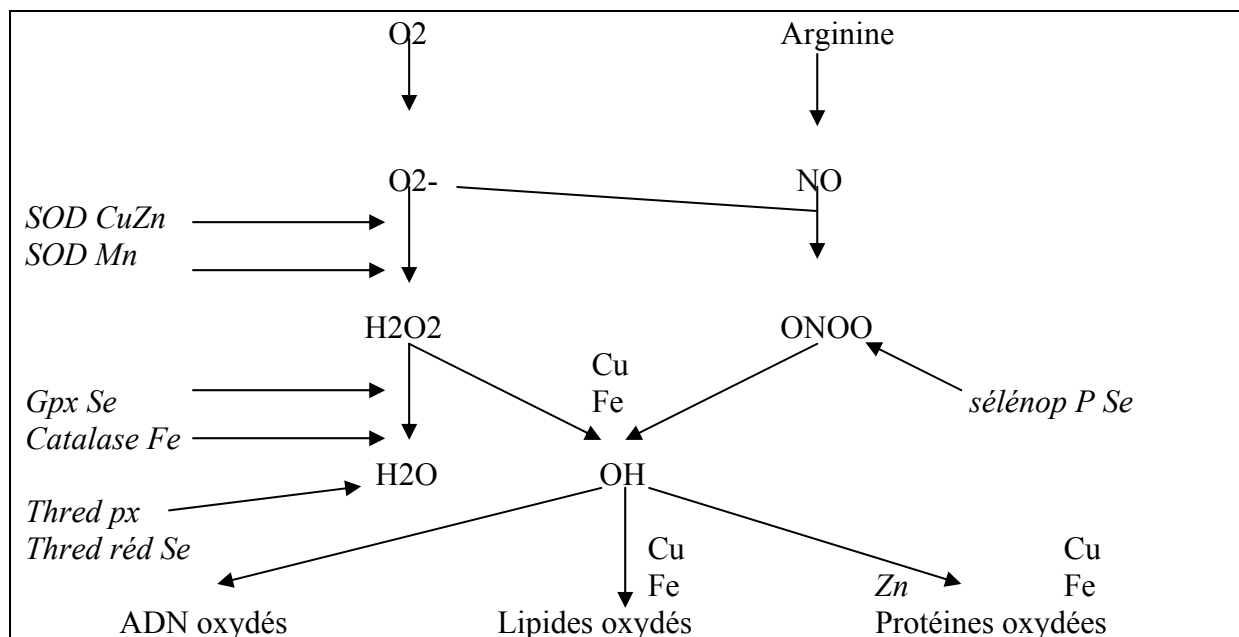


Figure 9 : Principaux systèmes antioxydants actifs de l'organisme

I.1.3.1.3. Système passif

Lorsque les systèmes précédents s'avèrent insuffisants et que le stress oxydatif est trop important, les radicaux libres subissent l'action d'un dernier système antioxydant composé de molécules telles que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoides, l'acide urique ou la taurine.

Ces composés vont permettre la réduction des radicaux libres oxygénés, mais il s'agit d'un phénomène limité par rapport au système actif n'agissant qu'à des concentrations élevées.

En général ces substances ne peuvent neutraliser qu'un seul radical par molécule. Elles sont souvent appelées piègeurs stœchiométriques. Cependant certaines peuvent se régénérer et sont capables de détruire un grand nombre d'oxyradicaux. En outre, c'est un système sur lequel on peut facilement agir grâce à la nutrition.

⇒ Vitamine E ou tocophérol :

La vitamine E regroupe en réalité toute une famille de molécules : les tocophérols. Mais on distingue essentiellement l'alpha-tocophérol qui est le principal antioxydant des membranes cellulaires et des acides gras poly insaturés. Cette molécule est formée d'un noyau chromanol qui porte un groupe -OH et d'une chaîne latérale de 16 atomes de carbone dont 3 sont asymétriques (108).

En réagissant avec les radicaux libres, cette classe de molécules forme du tocophéryl stable ce qui stoppe les réactions en chaîne :



On trouve essentiellement cette vitamine dans les céréales, les germes de graines et les huiles végétales. Une fois absorbée, elle circule dans le sang sur les lipoprotéines (LDL).

Elle est très sensible aux oxydants et à l'oxygène.

D'un point de vue biologique, elle est située dans les membranes cellulaires. Cette substance lipophile permet donc de protéger des lésions membranaires.

Son mode d'action est illustré dans le schéma suivant (Pr. Enjalbert, ENVT, cours d'alimentation, 1996):

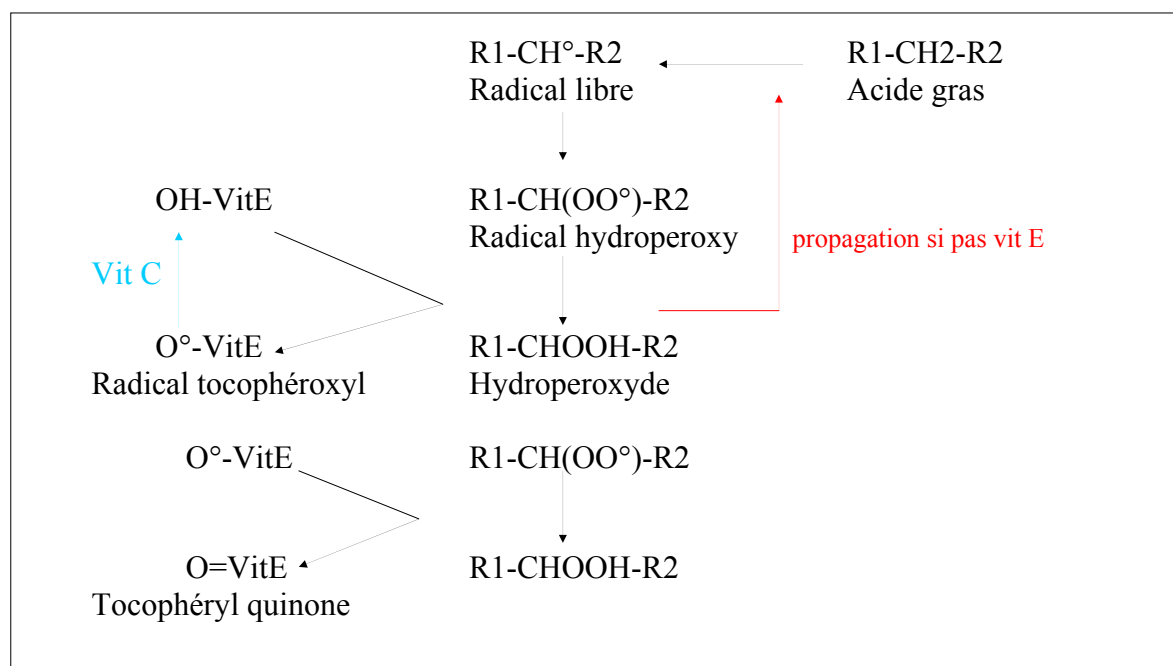


Figure 10 : Action antioxydante de la vitamine E

Cette vitamine est vraisemblablement l'antioxydant le plus important et efficace de cette catégorie et joue un rôle capital dans la protection de l'organisme (21,28,94); elle a été étudiée notamment pour la prévention des cancers (10) ainsi que dans les cas de risques d'athérosclérose et de problèmes coronariens (76). Chez les animaux, à doses élevées, elle semble aussi retarder la dégénérescence nerveuse.

Les bactéries peuvent être détruites par oxydation dans les phagocytes. En effet elles sont soumises aux RL produits par le phagocyte. Mais ces cellules de l'immunité sont elles aussi susceptibles de subir les effets délétères des RL. La vitamine E a un rôle protecteur à ce niveau, ce qui en fait un stimulant immunitaire non négligeable (27,44).

Chez les vieux chats, la réponse immunitaire à médiation cellulaire augmente de façon significative avec une supplémentation en vitamine E. De même chez les chatons, l'immunité dépend directement de la concentration en antioxydants.

⇒ *Vitamine C ou acide ascorbique* :

Produite par l'organisme, elle réagit avec le tocophéryl et régénère ainsi de la vitamine E. Elle forme le radical ascorbyl très stable aussi. Cette vitamine est hydrophile et n'a donc pas la même localisation que la vitamine E dans la cellule (16).

Elle est sensible à l'oxydation mais résistante à la chaleur et aux UV et plus stable en milieu basique. On la trouve dans la nature en grande quantité dans les agrumes.

L'acide lipoiq ue permet aussi la régénération des vitamines C et E.

⇒ *B ta-carotène ou provitamine A* :

Cette molécule n'est pas stœchiométrique car une seule peut piéger des centaines d'O2 singulet. Son rôle antioxydant est important et ne dépend pas de sa transformation en vitamine A.

Chez l'homme, le β -carotène est à l'origine de la vitamine A, molécule également antioxydante mais moins performante que son précurseur. Le chat ne transforme pas cette molécule en vitamine A, contrairement au chien.

Les fourrages sont riches en bêta-carotène, notamment s'ils sont déshydratés. En effet, ils sont moins oxydés par la lipooxygénase si la lumière et l'humidité sont limitées. Mais cette provitamine se trouve aussi en grande quantité dans le foie, le lait, les œufs et les légumes.

L'absorption de cette vitamine et de son précurseur est liée à celle des lipides. Les animaux âgés et plus particulièrement le chat ont besoin d'un apport supplémentaire en vitamine A car la digestibilité des lipides est diminuée.

Ces caroténoïdes semblent, à dose relativement forte, capables de réduire la croissance et le développement de certaines tumeurs.

⇒ *Lutéine* :

Les chats et chiens sont capables d'en absorber des quantités significatives dans leur sérum. Elle est utilisée dans des cellules telles que les lymphocytes et les neutrophiles et permet de neutraliser les dommages oxydatifs (20). Chez le chien, le mécanisme d'hypersensibilité retard se trouve réhaussé. Chez le chat, la réponse vaccinale (DTH) ainsi que le taux d'immunoglobulines G augmentent avec la lutéine.

Ainsi l'immunité cellulaire et humorale est stimulée, lorsque les animaux sont jeunes ou au contraire vieillissants.

Tous ces antioxydants sont donc présents à l'état naturel dans les fruits et légumes.

⇒ *Les flavonoides* :

Il s'agit de polyphénols d'origine végétale rentrant dans la catégorie des antioxydants stœchiométriques. Ces substances sont aussi régénérées par la vitamine C.

On les trouve dans la pelure du raisin, la sauge, le romarin, le chocolat ou encore le ginkgo biloba.

⇒ *Taurine, bilirubine et acide urique* :

Elles aussi ont un pouvoir antioxydant. On les trouve naturellement dans le foie, les reins et le lait maternel.

La taurine est un acide aminé que l'on obtient soit par l'alimentation ou bien de façon endogène par le métabolisme de la cystéine illustré par la figure 11. Cette substance est doublement antioxydante : elle piège donc les RLO et atténue la désorganisation membranaire liée à la peroxydation. De plus, elle semble ralentir la diminution de l'immunité cellulaire en particulier par les lymphocytes T, phénomène fréquemment observé avec l'âge.

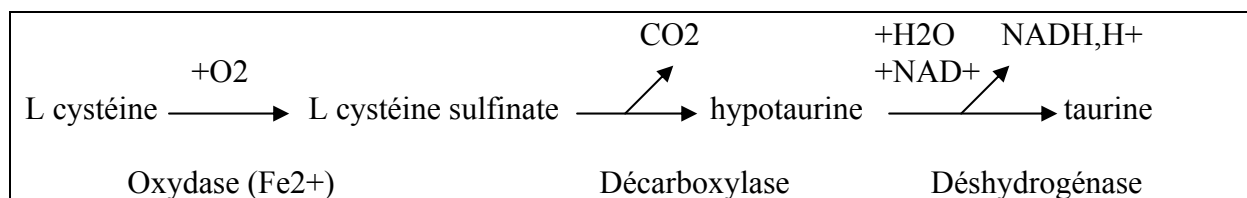


Figure 11 : formation de la taurine et catabolisme de la cystéine

⇒ *Co-enzyme Q10 ou ubiquinone* :

Ce facteur est présent dans les membranes cellulaires .

En somme, ces différents systèmes antioxydants (enzymes ou piégeurs) sont répartis de façon inégale dans les tissus. Et à l'échelle de la cellule, chaque compartiment a ses mécanismes propres (cytosol, mitochondrie, membrane ou peroxysome). Cela explique qu'il soit difficile de généraliser ces phénomènes et d'anticiper la réaction des organes face au stress oxydatif. Le principal antioxydant est la vitamine E mais les autres systèmes sont complémentaires comme le montre la figure suivante issue de notre cours d'alimentation (Pr. Enjalbert, ENVIT, 1996) :

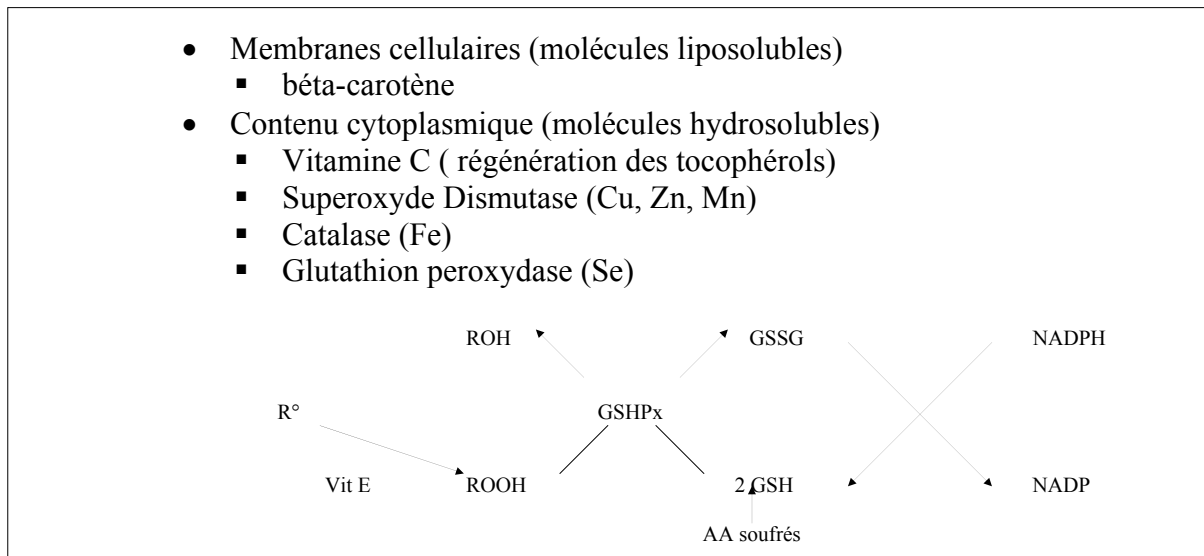


Figure 12 : Localisation cellulaire des principaux systèmes antioxydants

Les propriétés antiradicalaires de ces molécules sont donc indéniables. On mesure toute leur importance lorsqu'on voit le nombre de maladies où les peroxydes interviennent. La nutrition, en adaptant la composition en vitamines et autres antioxydants de la ration à l'organisme, a et aura encore plus un rôle thérapeutique primordial.

I.1.3.1.4. Système réparateur

Lorsque des molécules ont été endommagées par les RLO, l'organisme dispose aussi de quelques molécules capables de les « réparer ».

En effet, l'ADN nucléaire peut être parfois corrigé par des enzymes « excision-repair endonucléases » ou « transcriptases réverses » présentes dans le noyau.

Il existe aussi des molécules capables de restaurer la fonction de certaines protéines enzymatiques oxydées comme la méthionine sulfoxyde réductase en régénérant l'acide aminé méthionine. Ces réparations restent néanmoins des moyens tout à fait restreints en cas de stress oxydatif et de dommages cellulaires importants.

I.1.3.1.5. Système précurseur

Parmi tous les systèmes antioxydants cités, nous avons pu constater le rôle essentiel de certaines enzymes ou de certaines molécules.

Ces molécules pour être actives nécessitent souvent la présence de certaines substances entrant dans leur formation, ou permettant la catalyse de la réaction chimique.

⇒ *Oligo-éléments* :

De nombreux métaux interviennent dans l'activité antioxydante et notamment par l'intermédiaire des systèmes enzymatiques vus précédemment (55).

Par exemple, le zinc est indispensable dans le fonctionnement de la superoxyde dismutase (54), et le sélénium dans celui de la glutathion peroxydase.

Ces oligo-éléments sont donc des éléments indispensables à la lutte antioxydante (82).

Cependant, certaines études ont montré qu'un excès de certains de ces éléments avait au contraire un rôle pro-oxydant. En effet, le cuivre et le fer sous forme libre peuvent être à l'origine de la production de RLO très réactifs lors de la réaction de Fenton (formation de OH à partir de H₂O₂). Le fer peut également former des RL lorsqu'il est sous forme réduite anormale (hème des méthémoglobines).

Le zinc comme le manganèse ou le sélénium peuvent aussi être nocifs en cas d'apport ou de concentration exagérés. Par exemple, le sélénium s'avère très toxique en grande de quantité.

⇒ *Acides aminés* :

Nous pouvons ici signaler l'intervention de la N-acétyl-cystéine, analogue du glutathion et donc indispensable à la détoxification des RLO par l'organisme (voir action de la Gpx).

Le glutathion ou ses analogues contribuent aussi à la régénération de la vitamine C (74).

I.1.3.2. Rôle de l'alimentation

Le stress oxydatif cause des dommages multiples. Les mammifères, notamment les chiens et les chats, sont sensibles à ces phénomènes. Des facteurs extérieurs peuvent induire ce stress. Ainsi selon les conditions environnementales et sociales, le statut des organismes peut varier. Un organisme fragilisé ou mal nourri sera plus exposé aux troubles oxydatifs. Mais l'alimentation a spécialement un rôle important dans l'apport de composés antioxydants.

I.1.3.2.1. Rôle prooxydant

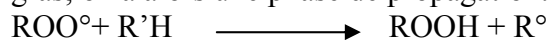
I.1.3.2.1.1. Composition

⇒ *Acides gras* :

Les acides gras polyinsaturés des aliments comme ceux constitutifs de l'organisme sont très sensibles à l'oxydation et créent des peroxydes. Ce phénomène de rancissement est constitué d'une phase d'initiation sous l'action de l'oxygène moléculaire :



Les entités radicalaires ainsi formées vont à leur tour provoquer l'oxydation d'autres acides gras; on a alors une phase de propagation:



Comme dans l'organisme, le phénomène peut s'auto entretenir dans l'aliment.

Il faut compléter ce mécanisme par une phase de terminaison au cours de laquelle les hydroperoxydes se transforment en cétones ou aldéhydes responsables de l'odeur désagréable des aliments. On finit aussi par obtenir des composés à doubles liaisons conjuguées appelés diènes.

Ces matières grasses, une fois rances, créent des troubles digestifs et peuvent être absorbées mais peuvent aussi s'oxyder au sein de l'organisme une fois absorbées.

Elles sont alors à l'origine d'un stress oxydatif et sont principalement responsables de la peroxydation des lipides constitutifs.

Des scientifiques ont montré qu'un régime alimentaire riche en AGPI doit être compensé par l'addition de vitamine E. Dernièrement, on est passé à une recommandation de 1 UI par gramme d'AGPI (acides gras polyinsaturés).

Une alimentation très riche en acides gras polyinsaturés, en particulier des acides gras très fortement insaturés (EPA et DHA dérivés de l'acide linoléique fréquents dans les poissons) rend l'organisme sensible aux RLO et à ses effets. On sous-divise les acides gras polyinsaturés en 2 séries : $\omega 3$ ou $\omega 6$.

Les premiers ((l'acide linoléique et dérivés) ont une action modeste sur la cholestérolémie, peuvent élèver le HDL (bon cholestérol) mais leur excès provoque une augmentation du cholestérol LDL (mauvais cholestérol).

Quant à la série $\omega 6$ (notamment l'acide linoléique), elle a un effet hypocholestérolémiant avec baisse du HDL. Même si l'acide linoléique n'augmente pas directement le taux de LDL, son excès et son incorporation dans les lipoparticules favorise la peroxydation des LDL.

De plus un régime très riche en acides gras (notamment saturés) est un facteur favorisant l'obésité. Or l'obésité crée secondairement un stress oxydatif à l'origine de diverses autres pathologies. Ces acides gras saturés ont un effet hypercholestérolémiant avec augmentation du « mauvais cholestérol » LDL car ils diminuent l'activité des récepteurs LDL du foie capables de l'épuration.

L'excès d'AG $\omega 3$ fortement insaturés et d'acides gras saturés induit une augmentation du LDL et donc de sa possible peroxydation. Quant aux $\omega 6$, ils favorisent la peroxydation du LDL, LDL présent même à faible dose. Ils peuvent donc être tous à l'origine d'athérosclérose et de maladies vasculaires (6,11,39,60,72).

Diverses études ont donc montré que malgré une alimentation riche en AGPI et une baisse de la cholestérolémie, le taux de maladies coronariennes chez l'homme n'a pas bougé. Ils ont ainsi mis en évidence que réduire les graisses saturées et augmenter les insaturées ne suffisait pas à obtenir un effet réellement bénéfique. Il a donc été envisagé d'autres causes pouvant expliquer le potentiel néfaste des acides gras insaturés et notamment les $\omega 3$: la peroxydation semble être une explication capitale. Cependant d'autres facteurs, comme l'action des $\omega 3$ sur la thrombose et la viscosité sanguine, peuvent jouer un rôle néfaste (50,61).

En conclusion, l'alimentation lipidique doit être équilibrée et sans excès. Il faut tenir compte des hypercholestérolémies et des hypertriglycéridémies, mais aussi de l'éventuelle baisse du HDL et/ou du LDL peroxydé pouvant accompagner ces phénomènes. La ration doit donc être adaptée pour apporter quantité et qualité nécessaires. Aucune graisse n'est à proscrire mais tout est une question de proportion : saturée/insaturée et $\omega 3$ / $\omega 6$ (99).

⇒ *Excès d'oligo-éléments :*

Il a été montré plus haut, qu'un excès des ions Cu et Fe avait un rôle prooxydant (63,82). Par exemple, on suspecte le fer en excès d'être impliqué dans la maladie d'Alzheimer et le cuivre dans la pathogénie de certains cancers.

Il s'agit donc de limiter la supplémentation en métaux des aliments des mammifères. Ainsi des doses limites ont été définies ou sont actuellement étudiées au cours de divers protocoles expérimentaux.

I.1.3.2.1.2. Conservation

⇒ *Température, lumière, l'oxygène de l'air :*

Le rancissement oxydatif des corps gras d'un aliment découle de l'exposition à l'oxygène de l'air mais est largement facilité par la lumière ou chaleur. De plus certains antioxydants peuvent se trouver inactivés par ces mêmes paramètres. C'est pourquoi les aliments doivent être conservés à l'abri de ces facteurs.

I.1.3.2.2. Rôle antioxydant

Notre intervention dans la lutte antioxydante passe uniquement par l'alimentation. Un organisme en bonne santé dispose d'un système endogène de défense performant répondant à des agressions environnementales ou alimentaires classiques. Cependant en cas de stress oxydatif (exposition accrue, maladie ou vieillissement...), les études ont montré que la présence ou la complémentation en antioxydants des aliments peut améliorer largement la réponse de l'organisme et ralentir les effets nocifs de l'oxydation (17,46,52).

De nombreuses expérimentations ont été effectuées chez les hommes, mais aussi chez les animaux domestiques et particulièrement le chien et le chat (12-20).

Ces substances d'une grande diversité se trouvent dans la nature (dans l'organisme lui-même ou bien dans des sources extérieures notamment végétales) ou bien peuvent être synthétisées artificiellement.

⇒ *Chélateurs d'ions :*

Des molécules chélatrices de métaux tels que le fer (potentiellement générateurs de RLO) sont utilisées dans les aliments aussi. On utilise le plus couramment la desferroxxamine ou l'oxyglobeine.

⇒ *Substances du système passif :*

Nombreuses sont les molécules de cette catégorie qui se trouvent dans la nature et facilement utilisables et utilisées par l'industrie alimentaire.

On citera notamment la vitamine E mais aussi dans une moindre proportion la vitamine C, les caroténoïdes, la taurine ou le glutathion. Comme vu précédemment, ils sont indispensables pour lutter contre les dommages oxydatifs (74).

La vitamine E, principale substance à propriété antiradicalaire, existe sous différentes formes. Chaque forme a une activité variable, ainsi les tocophérols sont plus efficaces que les tocotrienols. Les tocophérols comprennent eux-mêmes plusieurs types de molécules dont la plus efficace est l'alpha tocophérol. Dans l'organisme, cette dernière est sous la forme de l'isomère d mais dans l'alimentation, on la trouve sous la forme d'un mélange entre les 2 isomères d et l.

Cependant, ces tocophérols présents surtout dans les huiles végétales peuvent être dégradés par l'oxydation avant d'être consommés. C'est pourquoi on va utiliser l'acétate d'alpha-tocophérol qui non hydrolysé est très stable. Son activité vitaminique E sera révélée par sa transformation en alpha-tocophérol au cours de la digestion dans les intestins. En présence de sels biliaires, la vitamine E est absorbée par les entérocytes et est transportée par les LDL du sang. On la trouvera essentiellement au niveau des graisses, des glandes endocrines et des thrombocytes de l'organisme et elle sera très peu métabolisée (104).

La complémentation semble indispensable. Les besoins en α -tocophérol sont de 1,4 UI/MJ de ration alimentaire chez le chien et le chat adultes (selon le National Research Council, 1985 et 1986). Il faudra d'ailleurs augmenter l'apport avec les acides gras insaturés de la ration.

Hormis les huiles végétales, les sources sont par contre restreintes et la vitamine E de synthèse coûte cher.

L'excès de supplémentation en vitamine E ne semble pas être toxique pour l'organisme mais des doses très élevées ne paraissent pas être plus bénéfiques. Chez le chat, il n'y a aucun avantage à introduire une dose >500 UI par rapport à une dose de 250 UI.

L'apport alimentaire recommandé (43,44) est de 50 UI/400 kcal chez le chien et 25 UI/400 kcal chez le chat adulte et en bonne santé. Un apport complémentaire de 10 à 20 fois les besoins minimaux en vitamine E est efficace et n'engendre pas d'effets néfastes.

La taurine est un nutriment essentiel et un complément alimentaire capital chez les mammifères carnivores. Son rôle est reconnu et étudié depuis les années 1970 et notamment chez le chat. Cette espèce produit de façon très insuffisante cet acide aminé car l'étape de décarboxylation du l-cystéine sulfinat ne se fait pas ou très peu. Son apport provient donc majoritairement de l'alimentation. L'apport alimentaire de cette molécule doit être de 250 mg/400 kcal pour les aliments en boîte et de 100 mg/400 kcal pour les aliments secs. Il est recommandé de doubler cette dose pour obtenir un taux plasmatique capable de limiter l'oxydation, sachant qu'aucune limite maximale n'a pu être définie. Chez le chien, on suit le même raisonnement faute d'étude.

La vitamine C, produite de façon endogène et suffisante par l'organisme du chien et chat, contrairement à la vitamine E, n'est pas à ce jour considérée comme un constituant alimentaire essentiel. La supplémentation en vitamine C est tout de même parfois utilisée chez nos animaux de compagnie. Il semble que cette complémentation antioxydante soit bénéfique notamment pour des organismes fragilisés ou déficients (animaux junior, senior, ou malades). De plus, une étude récente a montré qu'à la dose habituellement incorporée dans les aliments, la vitamine C augmentait dans le sang mais ne diminuait pas le pH urinaire et ne favorisait donc pas l'apparition de calculs d'oxalate chez le chat.

Les caroténoïdes alimentaires utilisés fréquemment chez l'homme ne sont pas considérés comme des composés essentiels de l'alimentation du chat. Une étude a permis de montrer que le bêta carotène et le lycopène (à partir d'huile de palme et de tomates) à faible concentration étaient absorbés mais aucune étude n'a permis de savoir quelle efficacité antioxydante précise en découlait pour l'organisme. Il semble néanmoins qu'ils permettent une augmentation de l'immunité (19). Ils font souvent partie d'une association de plusieurs antioxydants dans la nourriture industrielle de nos animaux domestiques. La ration du chien adulte en bonne santé est supplémentée avec environ 0,3 mg/1000 kcal de vitamine A et celle du chat à 0,21mg.

Les poly phénols, composés alimentaires fréquents, peuvent contribuer aussi au statut antioxydant.

⇒ *Ions intervenant dans les systèmes enzymatiques antioxydants :*

Le plus fréquemment utilisé et étudié est le sélénium. Il permet à l'organisme d'activer la glutathion peroxydase. Le Se a peu de sources non spécifiques: sous-produits des céréales et des tourteaux mais peut provenir de sources spécifiques telles que le sélénite ou le sélénate de Na.

On peut aussi supplémenter les aliments en cuivre ou en manganèse, mais toujours à doses raisonnables. Certains tourteaux apportent du Cu ou du Zn, la farine de viande du Zn mais ce sont surtout à partir des sels minéraux peu chers (à l'inverse des sels organiques) dont sont issus ces oligo-éléments.

⇒ *Allopurinol et créatine* :

Ces 2 composés sont parfois rajoutés dans l'alimentation des chiens et des chats pour leur action antioxydante au sein de l'organisme.

L'allopurinol inhibe la xanthine oxydase (figure 13) et la créatine inhibe la formation d'hypoxanthine à partir d'AMP. En effet le système xanthine oxydase peut être à l'origine de la formation de RLO (Cf rappel sur la chaîne respiratoire et la réduction du cytochrome c).

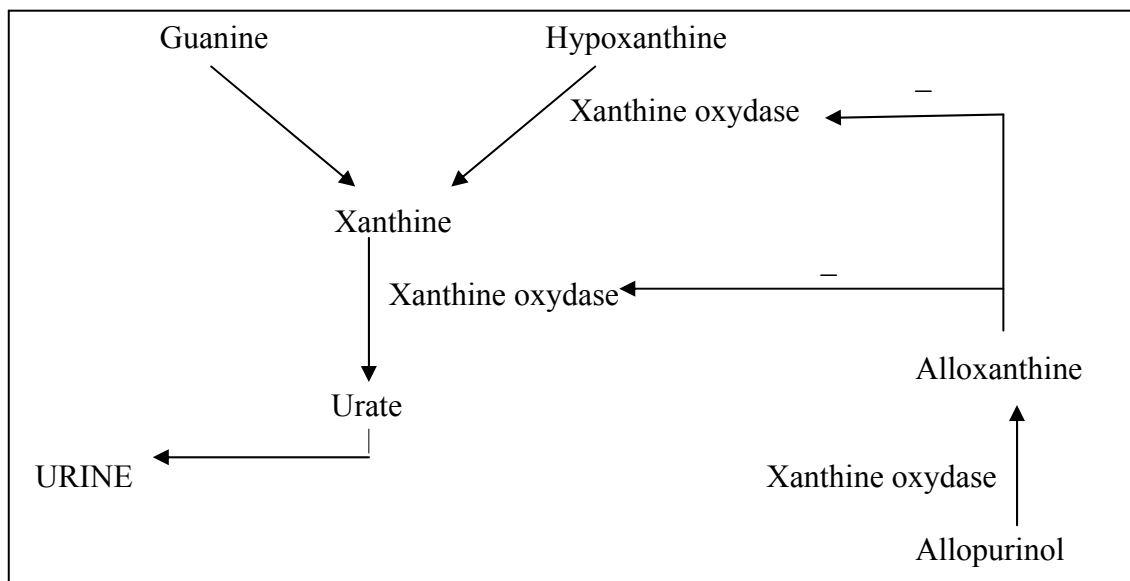


Figure 13 : Action antioxydante de l'allopurinol

En conclusion, l'alimentation peut être à l'origine du phénomène de peroxydation dans les aliments et les organismes. Néanmoins elle permet essentiellement de lutter contre les effets des radicaux. Les antioxydants ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Ils sont nombreux et variés. En outre, ils agissent à des sites (cellulaires et organiques) et à des moments différents dans l'organisme. Ils sont devenus un élément essentiel des régimes alimentaires aujourd'hui. Ils représentent aujourd'hui un réel intérêt médical et économique pour les industries agroalimentaires. De nombreuses études sont encore en cours mais déjà leur intérêt chez les chiens et chats est démontré. On ajoute donc dans de nombreuses formulations, et notamment dans des aliments à visée thérapeutique, un complément en antioxydant ou même une association de plusieurs antioxydants. C'est particulièrement le cas des aliments pour chiens et chats âgés supplémentés en vitamine E, C et autres oligo-éléments pour lutter contre le vieillissement. Ou c'est encore le cas des aliments pour animaux diabétiques, cardiaques, ... qui ont vu leur composition s'adjoindre de vitamine E.

I.2. Les peroxydes dans l'alimentation

L'objectif de cette partie est de voir comment l'altération oxydative des aliments a lieu, comment la quantifier et quelles sont ses conséquences.

I.2.1. Lipides et matières grasses dans la ration

La ration alimentaire des chiens et des chats comprend, comme tous les aliments, de l'eau et de la matière sèche. Cette dernière se décompose en matière organique et matière minérale. La matière organique rassemble les protéines brutes, les matières grasses, la cellulose brute, et l'extractif non azoté.

La matière grasse d'un aliment est très souvent exprimée en % de la matière sèche ou en % de la matière brute.

Elle correspond aux lipides mais aussi aux vitamines liposolubles ainsi qu'aux pigments. On sépare, dans la catégorie des lipides, les lipides de réserves de ceux de constitution. Les lipides de réserves, constitués de triglycérides et de galactolipides, représentent en général l'essentiel de la ration. Cependant les lipides de constitution, c'est à dire les phospholipides, même en quantité moindre ont un rôle qualitatif primordial car il s'agit très souvent d'acides gras essentiels.

Les lipides sont à base d'acides gras (chaîne hydrocarbonée aliphatique se terminant par une fonction acide), dont la structure peut être ou non insaturée, voire polyinsaturée. Pour désigner un acide gras, on détaille son nombre de carbones et de doubles liaisons, ainsi que la configuration spatiale et surtout la position des doubles liaisons. Ainsi un acide gras $\omega 3$ va comporter une double liaison en 3 à partir de la terminaison méthyl. Pour exemple, prenons l'acide linoléique de nomenclature suivante C18:2 $\omega 6$: il est composé de 18 carbones, 2 doubles liaisons, la première en 6 (et la seconde en 9).

Les acides gras essentiels sont des acides gras polyinsaturés.

L'organisme utilise ces substances sur un plan structurel : ils composent les membranes et le tissu nerveux, mais aussi sur un plan biologique : ils permettent de former les eicosanoïdes et donc interviennent dans les processus de l'inflammation, de l'immunité, de vasodilatation et dans l'intégrité cutanée.

Les lipides sont des constituants essentiels du régime alimentaire. Chez les carnivores, ils représentent de 8 à 30 % de la ration.

Ils ont un rôle industriel en tant que liant et un rôle économique car ils apportent plus d'énergie que les glucides pour un coût moins important. De plus, ils ont un intérêt nutritionnel évident : apport d'énergie, augmentation de l'appétence, source d'acides gras essentiels.

Cependant, ces lipides ont aussi des limites et ne peuvent être utilisés de façon irraisonnée : leur quantité excessive peuvent déséquilibrer le ratio à respecter entre l'énergie et les protéines ou être à l'origine d'un excès de consommation d'énergie.

Leur qualité peut aussi engendrer des problèmes notamment selon leur sensibilité à l'oxydation.

Utilisés en proportion accrue ces derniers temps, il semble important de savoir si cette sensibilité les rend dangereux pour les organismes et notamment ceux des chiens et des chats qui sont nourris très souvent selon un régime exclusif sur de longues périodes.

I.2.2. Altération des corps gras

Les matières grasses sont instables et peuvent être dégradées. On distingue plusieurs phénomènes de rancissement dont le rancissement oxydatif.

Le rancissement lipolytique est une hydrolyse des triglycérides sous l'action d'une lipase, les acides gras formés ont alors une odeur et un goût altérés, et sont plus sensibles à l'oxydation.

Le rancissement cétonique, plus rare, affecte les acides gras à courtes chaînes et provoque l'apparition d'une fonction cétone. Il est dû à des champignons et provoque une odeur forte et désagréable.

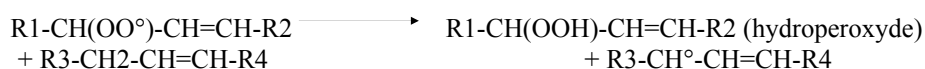
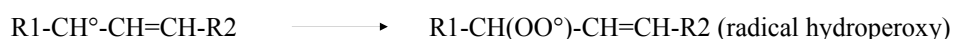
Enfin, nous allons aborder le *rancissement oxydatif*: il ne touche que les acides gras insaturés et notamment les polyinsaturés. Le phénomène est tout à fait similaire à la peroxydation in vivo et les lipides oxydés ingérés entraînent les mêmes conséquences sur l'organisme. Dans l'aliment, l'altération oxydative des lipides se fait uniquement en présence de dioxygène (O₂) comme dans l'organisme mais est provoquée par la présence de lumière (UV), de chaleur et/ou de certains métaux (Fe, Cu).

Il provoque leur dégradation complète et s'auto entretient par une suite de réactions en chaîne que nous avons rappelée dans la figure 14 :

1) Initiation (O₂ + métaux Fe ou Cu, UV)



2) Propagation (réaction en chaîne)



3) Terminaison

Scission des hydroperoxydes

Aldéhydes (odeur de rance)

Dismutation des hydroperoxydes

Acides aldéhydes, a. alcools, a. cétones (R1-CO-CH=CH-R2)

Doubles liaisons conjugués (-CH=CH-CH=CH-CH-)

Oxypolymérisation

Polymérisation de triglycérides

Figure 14 : Rancissement oxydatif des lipides de la ration (Pr. Enjalbert, ENVT, cours d'alimentation, 1996).

Cette réaction débute très lentement puis s'accélère de façon exponentielle au fur et à mesure que les peroxydes se forment. On a donc dans un premier temps apparition de peroxydes puis dans la phase suivante de diènes voire triènes conjugués et enfin de produits volatils. Les produits formés sont divers et variés.

Les substances rances modifient le goût et l'odeur de l'aliment et altèrent sa composition et ses propriétés nutritionnelles. Les effets néfastes des peroxydes sont donc non négligeables au sein même de l'aliment :

- diminution de l'appétence
- altération des acides gras essentiels à l'origine de carences qui peuvent notamment toucher la peau et les poils
- formation de produits toxiques à l'origine d'un stress oxydatif
- destruction de certaines vitamines.

Ces lipides oxydés semblent suivre le même mécanisme d'absorption que les lipides non altérés. La digestion des lipides se fait essentiellement dans l'intestin grêle. Ils y traversent la muqueuse après action des sels biliaires et des lipases, puis se retrouvent dans le sang ou la lymphe sous la forme de chylomicrons, lipoprotéines à faible densité (LDL) ou acides gras à courte chaîne. A ce jour, très peu d'études ont porté sur le mécanisme précis de l'absorption des peroxydes alimentaires chez le chien et le chat..

Ces corps gras altérés ne sont en aucun cas bénéfiques à l'organisme. Sur le plan local, ils peuvent provoquer des diarrhées et sont mis en cause dans les cancers de l'intestin. Sur le plan général, ils augmentent le pool des RLO circulants in vivo, voire plus largement créent ou accentuent un stress oxydatif.

On ne sait pas si les effets délétères sur la santé sont directement liés à leur quantité dans l'aliment, et si les quantités présentes dans des aliments usuels (qui n'ont pas subi d'exposition particulière) sont suffisantes pour créer des troubles.

Il apparaît cependant une corrélation positive entre la quantité d'acides gras oxydés et la teneur en lipoprotéines oxydées du sang. Si des peroxydes sont ingérés en grande quantité, un stress oxydatif est indéniable (LDL oxydées augmentées mais aussi tous les RLO de l'organisme et système de défense diminué) mais difficilement quantifiable pour savoir à partir de quel stade il est responsable d'affections cliniques. Actuellement, de nombreux scientifiques étudient les conséquences des peroxydes alimentaires sur l'organisme. Diverses études ont été menées et ont donné de nombreux résultats qui restent cependant incomplets (29).

Ainsi, on a prouvé que chez l'homme, les peroxydes alimentaires sont absorbés par l'intestin grêle, incorporés aux chylomicrons et augmentent le nombre de RLO dans le sérum (90).

En outre le cholestérol oxydé alimentaire est à l'origine de l'augmentation des lipoprotéines LDL oxydées dans le sérum, qui est un facteur de risque de l'athérosclérose (87).

Chez des patients diabétiques, dont la maladie est peu contrôlée, l'ingestion de lipides oxydés provoque une augmentation importante et soudaine des lipides oxydés des chylomicrons circulant dans le sang. Il semble donc qu'en cas de diabète, les peroxydes alimentaires accroissent le risque d'athérosclérose (88).

Chez les rats, on a observé qu'une consommation excessive de lipides oxydés augmente les LDL circulantes, et diminuent les taux de vitamines E et C ainsi que du glutathion dans le sang. Les peroxydes alimentaires ont donc accentué le stress oxydatif in vivo en augmentant la teneur en lipides peroxydés dans le sang et en diminuant le système antioxydant (31,85). Dernièrement, une étude a montré que la consommation d'un aliment rance a altéré la morphologie et la physiologie de la glande thyroïde (91). De même, elle serait à l'origine d'une diminution de l'activité des enzymes hépatiques (30).

Chez les lapins, des scientifiques américains ont aussi suggéré que la quantité de lipides oxydés d'un aliment usuel (teneur en peroxydes habituelle) pouvait suffire à augmenter le risque d'athérosclérose (89).

Enfin, chez les animaux domestiques et notamment chez le chien, les peroxydes alimentaires affectent la croissance, le bilan antioxydant et les fonctions immunitaires de l'organisme. Même avec des taux modérés de peroxydes, des troubles sont apparus. Le chiot, dont la croissance est rapide durant les premiers mois de sa vie, semble être un bon modèle pour extrapoler les risques de la peroxydation alimentaire chez l'enfant et l'adolescent (95).

Alors que peroxydes alimentaires sont à l'origine de peroxydes in vivo, aucune corrélation entre les acides gras oxydés présents dans les aliments et la présence de diènes ou triènes conjugués dans la structure de l'organisme n'a pu à priori être mise en évidence pour l'instant (97).

Ces études récentes montrent que les peroxydes alimentaires peuvent être à l'origine d'un stress oxydatif augmentant le risque d'apparition des maladies citées dans le chapitre précédent. La plupart de ces recherches viennent d'être publiées et d'autres études ne sont pas achevées pour préciser notamment les risques en fonction de l'altération lipidique des aliments et en fonction de son facteur quantité. On peut tout de même affirmer avec certitude que les systèmes antioxydants sont nécessaires pour stopper ce phénomène au sein de l'organisme mais aussi dès la première phase de l'auto oxydation des aliments.

I.2.3. Système de prévention dans la ration

En plus du rôle antioxydant simultané que joue l'alimentation pour l'organisme et pour les constituants alimentaires, on distingue un autre procédé destiné à protéger les lipides du rancissement quasi-exclusivement dans la ration : les antioxydants de synthèse.

Les BHA (butyhydroxyanisole), BHT (butyhydroxytoluène), ethoxyquine ont été largement utilisés par l'industrie alimentaire mais très sujets à controverses.

Les industries aujourd'hui préfèrent utiliser des substances antioxydantes naturelles plus appréciées des acheteurs, et continuer les recherches dans cette voie. Mais ces antioxydants naturels sont souvent, à dose égale, moins efficaces et donc plus coûteux.

I.2.4. Mesure du phénomène de rancissement oxydatif

On peut estimer ce phénomène par diverses méthodes selon le degré d'oxydation .

Tout d'abord, il existe des tests simples pour apprécier l'oxydation : il s'agit tout simplement de sentir le produit concerné. En effet l'odeur de rance est un critère physique très utile et très pratique.

La première méthode consiste à mesurer *l'indice de peroxyde* : on mesure l'oxygène actif (radical hydroperoxy ou hydroperoxyde) présent dans l'aliment. Pour ce faire, on le fait réagir avec l'iodure de potassium et on obtient une libération de I₂.

On exprime cet indice en millimoles et surtout en milliéquivalents par kilogramme de corps gras. Il est compris entre 1 et 10 meq/kg, en général < 2 meq/kg pour un aliment normal.

Le détail de cette méthode sera présenté ultérieurement.

La qualité des matières grasses et leur sensibilité à l'oxydation peuvent être approchées grâce à la mesure de leur résistance à l'oxydation. Cette dernière est exprimée par le *temps de swift* (TS). Cette méthode qui consiste à mesurer le temps mis par un corps gras traversé par un courant d'air à 98° pour atteindre un IP de 20 meq/kg MG est peu utilisée par rapport à la précédente. Un aliment normal a un TS de 40h environ.

On utilise de plus d'autres méthodes pour estimer l'oxydation des corps gras et notamment les produits secondairement formés. Ainsi la *spectrophotométrie ultraviolette* en testant deux longueurs d'ondes différentes permet d'estimer la quantité de diènes (ou de peroxydes d'acide linoléique) et de triènes conjugués. Cette méthode aussi utilisée dans notre protocole sera illustrée plus tard.

Pour estimer les produits terminaux volatils, on utilise le plus souvent la chromatographie en phase gazeuse.

Ces différentes méthodes permettent de doser le degré d'oxydation d'un aliment. Il existe donc de multiples tests de laboratoire validés. Selon les produits recherchés, on se servira préférentiellement d'un procédé plutôt qu'un autre. Ces nombreux procédés peuvent être classés selon la méthode de détermination de l'altération: physique, physico-chimiques, ou chimiques. Le choix des tests peut alors dépendre aussi du matériel dont on dispose.

Ceci est très bien illustré dans le *manuel des corps gras* (figure 15 issue de Karleskind, E.; tome 2, p.1200).

	Physiques	Physico-chimiques	Chimiques
Tests simples	<i>odeur</i>		
Méthodes de Laboratoire	<i>UV</i> diènes et triènes AFNOR 60.223 <i>Analyse sensorielle</i>	Acides oxydés Produits volatils <i>Chromatographie</i>	<i>indice de Peroxydes</i> AFNOR T60-220 AOAC 965.33 <i>indice de p-anisidine</i> ISO 6885 <i>test TBA</i> <i>indice de carbonyle</i> <i>indice d'hydroxyle</i> <i>indice d'époxyde</i>
Tests accélérés de résistance à l'oxydation : test à l'étuve, <i>test de Swift</i> , ...			

Figure 15 : Méthodes de détermination de l'altération oxydative des aliments

En somme, le rancissement oxydatif voit divers composés apparaître au cours du temps : les peroxydes qui vont d'abord augmenter de façon importante mais qui ensuite vont diminuer au fur et à mesure que les produits terminaux vont paraître et augmenter.

Selon les produits recherchés et le matériel disponible, on choisit la méthode qui convient. Ainsi, et c'est ce que nous avons appliqué dans notre expérimentation, les peroxydes qui apparaissent en début d'oxydation seront estimés grâce à l'indice de peroxyde qui est le paramètre le plus connu. Les produits secondairement formés en fin de rancissement seront mesurés par spectrophotométrie. Ces méthodes, respectivement chimique et physique, nécessitent un matériel particulier, détaillé par la suite, présent ou procurable dans le laboratoire de l'ENVT. La figure 16 illustre l'intérêt des méthodes que nous avons choisies :

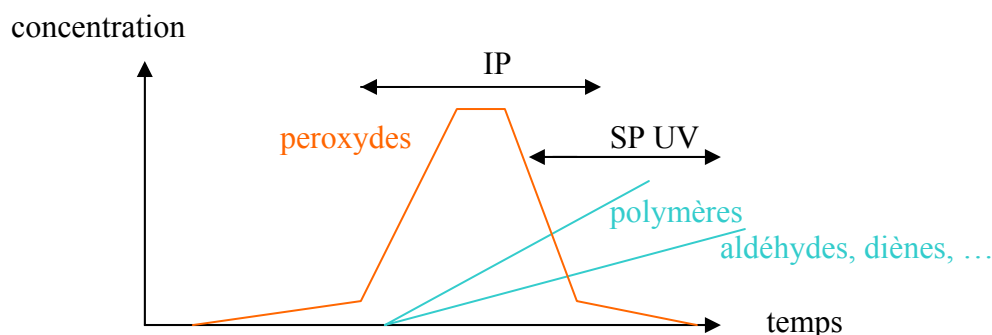


Figure 16 : Evolution du rancissement et méthodes choisies

II. LES PEROXYDES DANS LES ALIMENTS POUR CHIENS ET CHATS : APPROCHE EXPERIMENTALE

Le but de ce chapitre est d'évaluer l'état d'oxydation des aliments pour chiens et chats, c'est à dire de quantifier l'altération des matières grasses dans un panel d'aliments variés. Les méthodes de détermination sont nombreuses (Cf supra). Elles dépendent du type d'aliment, de son évolution en fonction de la température et de la présence de lumière. Nous avons utilisé des procédés du contrôle de l'oxydation qui se développe à température ambiante et non après chauffage sur nos échantillons.

Les premiers produits formés par le phénomène d'oxydation des matières grasses sont les peroxydes. Leur évaluation a été réalisée par une technique chimique basée sur le principe de dosage colorimétrique et plus précisément par la méthode AOCS-AOAC 965.33, 1965. De même que les méthodes AFNOR ou ISO 3960:1991, elle permet d'obtenir un indice de peroxyde.

Les produits secondairement formés au cours du processus d'oxydation sont les diènes et triènes conjugués. Afin de compléter notre étude, leur quantification a aussi été réalisée. La méthode de dosage utilisée est physique : on mesure l'absorbance de ces composés par spectrophotométrie selon la technique AFNOR T60-223 (ISO 3656 : 1989).

II.1. Echantillonnage

II.1.1. Choix des produits testés

Les échantillons choisis sont des aliments complets vendus librement en magasins spécialisés ou chez les vétérinaires. Ils sont au nombre de 36.

Il s'agit d'aliments pour la plupart secs sous forme de croquettes, ou d'aliments humides sous forme de conserves. On appelle « aliment sec » un aliment qui contient moins de 14% d'eau et « aliment humide » un aliment qui a une teneur en eau de 70 à 85% de la matière brute.

Ces aliments ont donc subi un procédé de fabrication différent. Ils ont notamment été exposés à deux méthodes de stérilisation distinctes. Les croquettes sont des aliments « extrudés » : les matières premières ont été soumises à l'effet de la pression et à celui de la température (90 à 150°C pendant un temps très court). Après séchage, on obtient un produit homogène enrobé ensuite plus ou moins de graisses en fonction de leur destinataire. Les pâtées quant à elles sont issues généralement de l'appertisation, c'est à dire qu'elles ont été maintenues à une température supérieure à 100°C (environ 1h30 dont 55 minutes à 120°C) et conditionnées dans des récipients étanches aux gaz, aux liquides et aux microorganismes.

Les produits oxydés ont été dosés sur des aliments destinés aux chiens mais aussi aux chats.

Nos échantillons visent des individus particuliers. Ils regroupent des aliments destinés aux juniors, adultes, seniors en bonne santé et des aliments à but thérapeutique tel que la prévention de calculs urinaires, de l'obésité, de troubles dermatologiques, du diabète,... Ils ont une composition différente et notamment des teneurs en matières grasses très variables. La quantité de matières grasses de l'aliment testé a été relevée sur son emballage et sera toujours exprimée par la suite en pourcentage de la matière brute.

Ces produits sont issus de différentes marques : Hill's, Science plan (gamme physiologique et Prescription diet), Waltham, Royal Canin, Eukanuba, Iam's. Le faible nombre d'échantillons pour chacune de ces marques explique que nos résultats ne seront en aucun cas représentatifs d'une marque.

Ce sont des produits qui n'ont pas subi de détérioration particulière, c'est à dire ni de chauffage excessif ni d'exposition à la lumière. Ils n'ont pas été ouverts au préalable, ont été conservés dans leur emballage intact et dans un pièce à 18°C environ.

Il faut noter que ces aliments ont des dates limite de consommation (DLC) presque similaires: juillet ou août 1999, et que leur date de fabrication est quasi-identique. Les tests ont tous été réalisés à quelques jours d'intervalles en mai et juin 1999. De ce fait le facteur temps influe très peu sur la quantité des peroxydes ou de produits secondaires selon les échantillons.

Tous les aliments utilisés dans cette étude sont inventoriés ici et classés selon leur forme ainsi que leur destinataire :

• **Aliments secs**

- aliments physiologiques pour animaux en croissance :
 - pour chats : 2 échantillons
 - pour chiens : 6 échantillons
- aliments physiologiques pour animaux adultes :
 - pour chats : 2 échantillons
 - pour chiens : 5 échantillons
- aliments physiologiques pour animaux senior :
 - pour chats : 2 échantillons
 - pour chiens : 2 échantillons
- aliments allégés en matières grasses :
 - pour chats : 3 échantillons
 - pour chiens : 2 échantillons
- aliments à visée thérapeutique :
 - pour chats : 1 échantillon

• **Aliments humides**

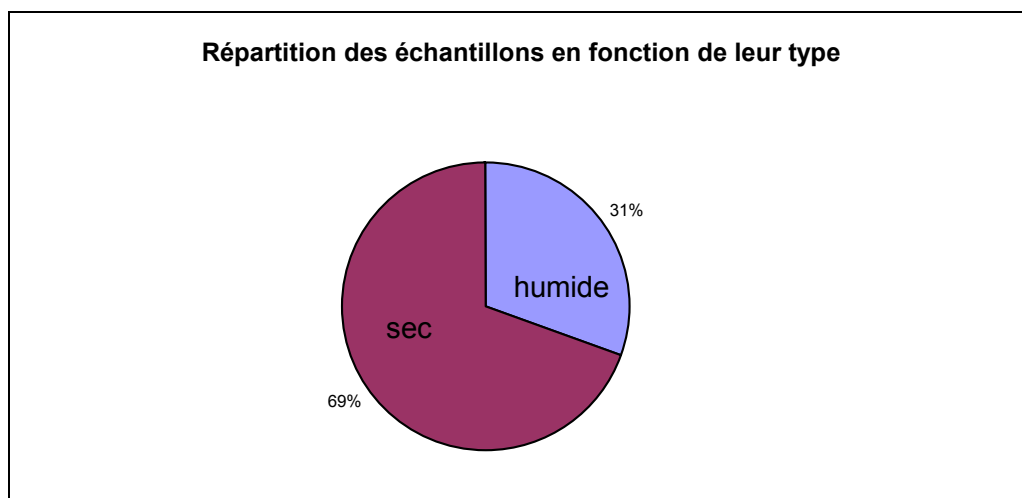
- aliments à visée thérapeutique :
 - pour chats : 4 échantillons
 - pour chiens : 4 échantillons
- aliments physiologiques pour animaux en croissance :
 - pour chats : 1 échantillon
 - pour chiens : 1 échantillon
- aliments allégés en matières grasses :
 - pour chiens : 1 échantillon

II.1. 2. Etude des échantillons

Les produits testés sont très variés. L'échantillonnage a été étudié selon le type, l'espèce cible, les particularités des animaux destinataires. Les peroxydes étant issus directement de la transformation des matières grasses de l'aliment, nous avons choisi de retenir aussi le taux de MG des aliments comme critère de comparaison.

II.1.2.1. Répartition des échantillons en fonction de leur type

Les échantillons testés sont en majorité des aliments secs sous forme de croquettes. Cependant des aliments humides c'est à dire sous forme de conserves ont aussi été testés. 25 aliments secs et 11 échantillons humides, quels que soient le destinataire et l'espèce cible, ont été dosés.



En proportion la forme humide représente donc 31% des échantillons et la forme sèche 69%, soit un panel sec comportant plus du double de références que le panel humide.

Si on étudie ces deux populations séparément, on s'aperçoit que la forme humide est difficilement comparable avec la forme sèche. Le nombre d'échantillons par panel est effectivement inégal, de plus ils ont une composition complètement différente. En effet, il ne faut pas oublier les grandes différences entre ces 2 panels :

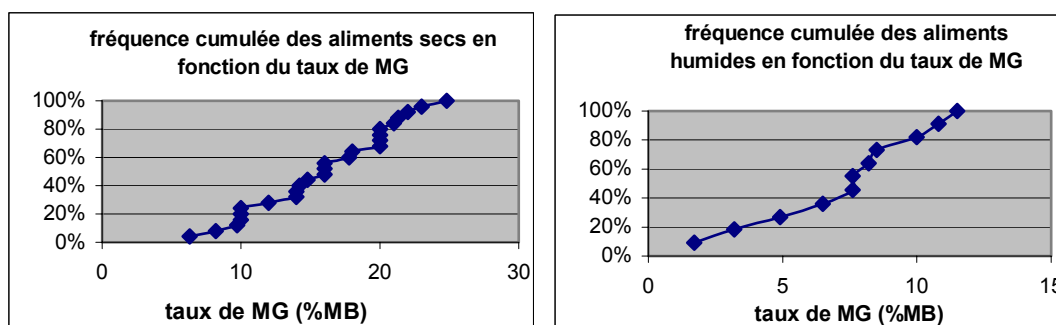
- leur traitement thermique
- leur teneur en eau et donc leur teneur en matières grasses (% de la matière brute)

qui peuvent être considérées comme des facteurs influant sur la dégradation oxydative et la quantité de peroxydes de ces aliments.

	Taux de MG (%MB)	Taux moyen MG	Ecart-type MG
Aliments secs	(6,2 ; 24,8)	16	4,9
Aliments humides	(1,5 ; 13,1)	7,3	2,9

Pour les formes sèches, le pourcentage moyen (m) de MG est de 16 alors que, pour les formes humides, il est à peine supérieur à 7. Les écarts types (s), respectivement d'environ 5 et 3, sont relativement élevés.

60% des échantillons secs ont des teneurs en MG comprises dans l'intervalle (m-1s;m+1s) soit (11,1;20,9) et 100% dans l'intervalle (6,2;25,8). Pour les boites, la majorité (64%) des échantillons présentent aussi une teneur en MG dans ce type d'intervalle (4,4;10,2) et 100% dans l'intervalle (1,5;13,1).



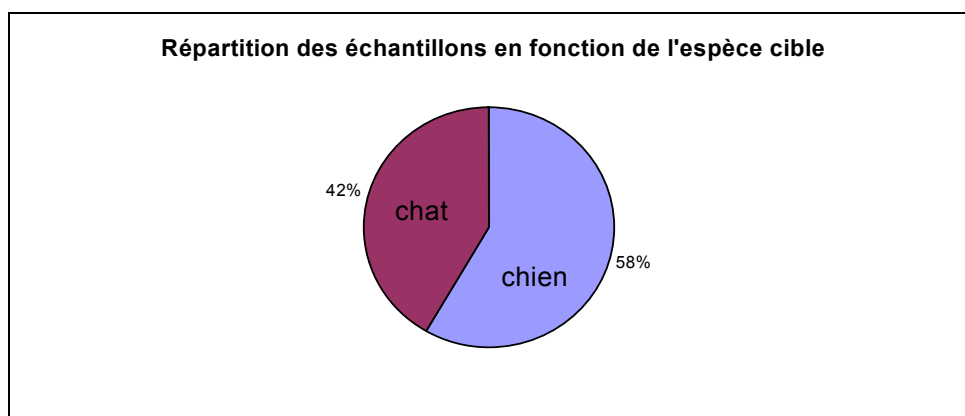
Ce type de graphique montre pour un taux de MG donné quel est le nombre d'aliments qui ont un taux inférieur ou égal à celui-ci. Cela met en évidence que, à titre d'exemple, pour un taux de MG de 10% (%MB), on compte déjà environ 25% des échantillons secs testés et 80% des échantillons humides analysés.

Lors de l'étude statistique, nous avons effectué la comparaison des moyennes de ces 2 types d'échantillons avec des écarts-types connus. Nous avons pu alors conclure qu'elles étaient significativement différentes (avec un risque 5%) et que ces deux populations n'étaient pas comparables.

II.1.2.2. Répartition des échantillons en fonction de l'espèce cible

Les échantillons étudiés sont uniquement destinés à nos animaux de compagnie les plus répandus, que sont les chiens et les chats.

Le schéma suivant permet d'illustrer que nous avons une majorité de produits pour chiens :



21 échantillons soit 58% de notre panel sont réservés aux chiens; les autres soit environ 42% de l'échantillonnage aux chats.

L'alimentation pour chats testée présente un taux moyen de matières grasses $m=15\%$ (%MB) avec un écart-type $s=6,1$ alors que $m=12\%$ et $s=5,8$ pour l'alimentation des chiens. Avec un écart-type comparable, on a tout de même une variation nette du taux moyen de MG de ces 2 populations. On constate un décalage important de la valeur minimale de nos 2 panels. En

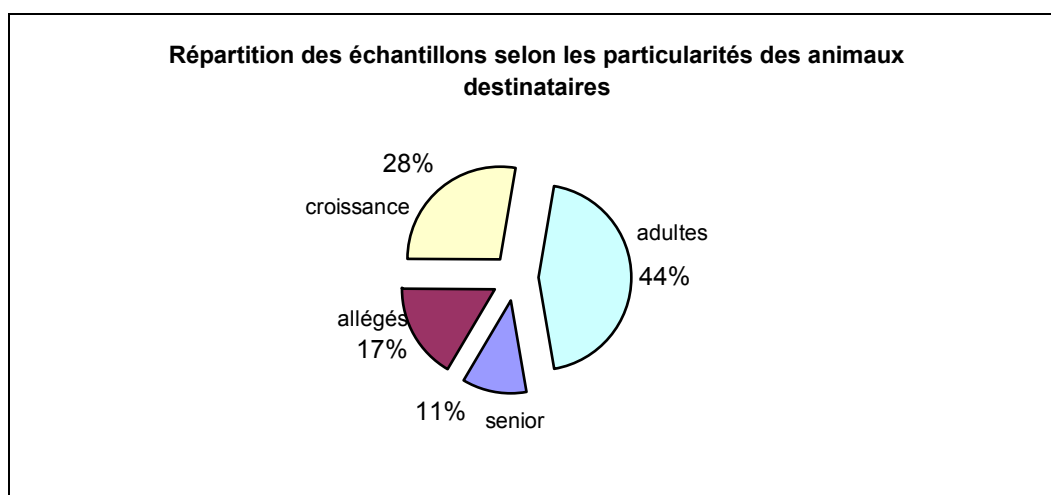
effet, les aliments pour chats ont un taux de MG compris entre (8,2;24,8) et ceux pour chiens entre (1,7;20). Ces populations sont significativement ($\alpha=0,05$) différentes.

Si nous avons bien 2 types d'aliments distincts, les produits de chacun ont subi la même technique de fabrication et proviennent de matières premières similaires. La différence dans la composition des échantillons des 2 espèces testées tient essentiellement dans le taux de MG, critère selon lequel nous allons étudier l'évolution oxydative des aliments. Quelque soit le type d'aliment ou son destinataire, la matière grasse est en général en plus grande quantité dans les aliments pour chats.

II.1.2.3. Répartition des échantillons en fonction des particularités des animaux destinataires

Tous les aliments secs testés ont pour indication des animaux en bonne santé. Cela comprend d'une part les aliments physiologiques complets et d'autre part les aliments donnés à but préventif qui luttent contre l'obésité et les calculs urinaires. Mais certains aliments humides ont une indication thérapeutique, par exemple l'insuffisance rénale.

En plus de varier en fonction de leur type et de l'espèce cible, ils peuvent donc aussi être classés en fonction du stade de vie et des particularités de leur destinataire comme le montre la figure suivante :



On distingue ainsi 4 catégories d'aliments :

- les aliments hautement énergétiques, donc destinés aux animaux en croissance (chiots et chatons jusqu'à l'âge adulte), aux femelles en gestation ou aux animaux dénutris en convalescence avec un taux moyen de MG de 17% de la matière brute. Les taux de MG des aliments secs de cette classe sont tous compris entre (14;24,8) et ils ont un taux moyen supérieur à 17% avec un écart-type relativement limité.
- les aliments dits « maintenance » ou à but préventif et thérapeutique destinés aux chiens et aux chats adultes dont le taux moyen de MG est de 12,5%.
- les aliments senior pour des animaux dans le tiers final de leur vie. Ce sont des aliments moins riches donc moins énergétiques car ils s'adressent à des animaux plus sédentaires.
- et les aliments dits « light » donc allégés en matière grasse, destinés à des chiens ou des chats souffrant le plus souvent de surcharge pondérale. Il s'agit la plupart du temps d'animaux avec un mode de vie plus sédentaires et /ou d'animaux qui ont été stérilisés.

Ils contiennent en moyenne environ 8% de MG.

On pourrait aussi distinguer les aliments selon le format des chiens auxquels ils sont destinés. Pour les grands chiens, les entreprises ont créé des formulations avec un taux de MG inférieur à celui d'un aliment pour chiens de petits formats. La demande d'énergie rapportée au kg de poids vif est en effet moins importante chez un chien de grand format.

Ces distinctions sont illustrées de façon descriptive ici car, compte tenu du peu d'échantillons, nous ne pouvons conclure à une différence statistiquement significative (avec $\alpha=0.05$) en fonction des destinataires dans notre panel. C'est pourquoi nos résultats ne seront pas analysés en fonction du statut physiologique ou pathologique ni en fonction de leur destinataire par la suite.

En somme, notre étude porte sur un nombre assez restreint mais varié d'échantillons. Cette diversité des échantillons explique leur différence de composition et nous essaierons d'apprécier le rôle de ces différents paramètres dans l'auto oxydation de ces aliments.

II.2. Matériel utilisé

Pour appliquer les méthodes de dosages chimiques et physiques choisies dans cette étude ; divers matériaux, ustensiles et appareils ont été nécessaires.

Le matériel est listé ci-dessous dans l'ordre chronologique des étapes successives effectuées dans notre expérimentation :

•*Broyage*

Broyeur WARING Commercial Blendor

•*Lyophilisation*

Lyophilisateur VIRTIS Sentry : Freezemobile 12SL

•*Extraction des matières grasses*

Balance SARTORIUS : max 424 g / min 0,5 g / dd=0,001 / e=0,01

Fioles à vides : 1 L

Buckner

Filtres sous cendres DURIEUX (Paris-France) : n° 111 / 185 m/m (=diamètre)

Erlenmeyers rodés : 300 ml

Ampoules à décanter : 250 ml

Tubes à centrifuger : 100 ml

Centrifugeuse CHRIST : 621123 2A (Paris labo)

Ballons rodés : 250 ml

Entonnoirs

Filtres : phase separators

Silicone Treated Filter Paper

Circles

125 mm (=diamètre)

Cat n° 2200 125

Whatman

(l'eau reste dans le filtre)

Pipettes : 10 ml

Evaporateur sous-vide HEIDOLPH VV2000

Balance SARTORIUS analytic : max 121 g / dd=0,1 mg / T=121 g

•*Dosage des peroxydes*

Burettes : 10 ml

Agitateur magnétique LABOVOLT

Eprouvettes : 50 ml

•*Mesure des diènes et triènes conjugués*

UV-visible spectrophotometer : Cam-Spec M 330

Fioles : 5 ml

II.3. Technique

Les méthodes choisies sont spécifiques de l'auto oxydation des matières grasses à température ambiante et les aliments n'ont pas subi d'altération excessive particulière. Les méthodes de dosage utilisées dans cette étude s'appliquent à des matières grasses isolées. Il a donc fallu dans un premier temps extraire les corps gras de chaque échantillon.

II.3.1. Extraction des matières grasses

Dans cette expérimentation, l'extraction s'est faite à froid et sous lumière diffuse afin d'éviter la décomposition des peroxydes .

En premier lieu l'aliment est broyé s'il est sec. Si l'aliment est humide, il est d'abord congelé et lyophilisé avant d'être broyé. Le broyage se réalise pendant 15 secondes à vitesse lente et 10 secondes à vitesse rapide.

Puis on prélève 10 g de broyat que l'on place dans un erlenmeyer.

On ajoute 100 ml d'un mélange chloroforme-méthanol, en proportion 2 volumes de chloroforme pour 1 de méthanol. On agite puis on filtre sous vide.

On recommence l'opération deux fois avec 50 ml du même mélange. A la fin du filtrage, on ajoute 50 ml de chlorure de sodium à 7,8%. Le liquide est alors versé dans une ampoule à décanter : la phase inférieure composée des matières grasses et du chloroforme est récupérée après plusieurs heures puis divisée dans deux tubes à centrifuger. La centrifugation se fait pendant 10 minutes. La phase chloroformique est pipetée puis filtrée dans un ballon rodé préalablement taré grâce à des filtres spéciaux retenant l'eau.

Afin de ne récupérer que les matières grasses, le ballon est placé sur l'évaporateur rotatif sous vide (150 tours par minute). On obtient donc les matières grasses sous forme d'huile épaisse brunâtre. Leur poids se calcule facilement en faisant la différence entre le poids du ballon vide et celui du ballon après évaporation.

On en prélève 5 mg pour les mesures d'absorbance puis on dose les peroxydes sur le reste.

II.3.2. Dosage des peroxydes

La méthode de dosage des peroxydes, premiers produits de dégradation des lipides alimentaires, utilisée est la méthode chimique AOAC 965-33 (Cf annexe p.74).

Elle permet à l'aide d'une réaction colorimétrique d'obtenir un indice de peroxyde.

Cet indice de peroxyde est le critère le plus connu pour évaluer l'altération oxydative des corps gras. Cette méthode a une sensibilité tout à fait satisfaisante.

Par définition l'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif du peroxyde contenus dans un gramme de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de

potassium avec libération d'iode. Cependant cet indice est exprimé en millimoles ou milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras.

Pour changer d'unité, il suffit d'utiliser les formules suivantes :

$$IP(\text{mmol})=IP(\text{meq})/2 \quad \text{et} \quad IP(\text{meq})=IP(\mu\text{g})/8$$

En général cet indice est compris entre 1 et 10 milliequivalents par kilogramme, selon le *manuel des corps gras* (le plus souvent $IP < 2 \text{ meq/kg}$).

D'après le *manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles* (Lecoq, R.; tome 2 F-2, p.1321), une matière grasse a un goût de rance lorsque l'indice atteint 10 à 20 millimoles par kilogramme, soit 5 à 10 milliéquivalents par kilogramme.

En résumé, cette méthode utilise deux réactifs : l'iodure de potassium (KI) et le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). En milieu acide, les peroxydes libèrent l'iode de l'iodure de potassium. Celui-ci est alors titré par le thiosulfate. L'expérimentation se déroule sous lumière du jour diffuse.

En premier lieu, on vérifie la qualité de l'iodure de potassium. On réalise le mélange suivant : 30 ml de chloroforme – acide acétique + 0,5 ml de KI + 2 gouttes d'empois d'amidon à 1 %.

Si la couleur vire au bleu, il faut refaire la solution d'iodure de potassium.

Ensuite on ajoute 30 ml du mélange chloroforme – acide acétique à l'échantillon de matières grasses et on remue pour dissoudre. Puis on ajoute 0,5 ml de KI et on agite le mélange occasionnellement pendant une minute. On ajoute encore 30 ml d'eau.

Le titrage débute alors : il se fait lentement en utilisant comme réactif du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,005 N) dans la burette avec un agitateur jusqu'à ce que la couleur jaune disparaisse.

On ajoute à ce moment 0,5 ml d'empois d'amidon à 1% ; et on poursuit la titration en remuant vigoureusement pour libérer tout l'iode du chloroforme jusqu'à ce que la couleur bleu disparaisse.

On peut alors calculer l'indice de peroxyde :

$$X = (S \times N \times 1000) / \text{g de MG}$$

avec $S = \text{ml de } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$N = \text{normalité de } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ (mol/L)}$

$X = \text{meq/kg}$

Nb : si à la normalité choisie, on obtient $S < 0,5 \text{ ml}$, il convient d'utiliser une solution plus diluée.

Cette méthode est bien sûr répétable et reproductible. Elle permet d'évaluer la quantité de peroxydes dans un aliment et ainsi de prévoir une détérioration ultérieure de ses matières grasses; cet aliment évoluant à température ambiante (peu élevée).

Les limites de ce procédé sont les suivantes :

- cette méthode dépend beaucoup de l'appréciation du technicien, le moment précis du changement colorimétrique étant en partie subjectif;
- les peroxydes se transforment ultérieurement en structures plus stables, par conséquent l'indice de peroxyde peut être faible alors que les matières grasses sont déjà rances ou devenues médiocres;
- les peroxydes se décomposent très vite s'ils sont chauffés et relativement lentement à température ambiante, c'est pourquoi l'indice de peroxyde ne sert pas pour des aliments qui ont été cuits.

Les principales causes d'erreur sont :

- l'addition de l'iode libéré sur les liaisons éthyléniques des chaînes grasses, donnant une valeur par défaut ;
- la formation d'iode par oxydation des iodures en présence de l'oxygène dissous dans le corps gras, donnant une valeur par excès.

II.3.3. Mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet des diènes et triènes conjugués

La méthode utilisée est une méthode physico-chimique basée sur la spectrophotométrie ultraviolette issue de la norme AFNOR T60-223.

Les diènes conjugués ainsi que les peroxydes de l'acide linoléique peuvent être dosés grâce à leur forte absorbance aux environs de 232 nm, et les triènes conjugués aux environs de 268 nm (234 et 270 d'après Frankel, E.N., dans *lipid oxydation*, The oily Press, p.83).

En effet, l'auto altération oxydative provoque la conjugaison des doubles liaisons des chaînes grasses poly insaturées.

Pour ce faire, on dilue 5 mg de matières grasses avec 5 ml d'éthanol dans une fiole.

On agite bien. Avant de débiter, un rinçage rigoureux des cuves doit être réalisé.

On remplit une cuve à quartz d'éthanol et une autre du mélange précédemment obtenue.

On place les cuves dans le même sens dans le spectrophotomètre.

Avant d'utiliser le spectrophotomètre, il convient de faire un blanc avec l'éthanol.

Puis on effectue les mesures de l'absorbance à 232/234 nm: à cette longueur d'onde on dose les diènes conjugués dérivant de la décomposition des peroxydes et les hydroperoxydes de l'acide linoléique.

On mesure ensuite l'absorbance à 268/270 nm: à cette longueur d'onde on dose les triènes conjugués et les composés carbonylés, produits secondaires de l'oxydation.

Ces valeurs d'absorbance $A(\lambda)$ ont été répertoriées et chaque mesure a été reproduite au moins deux fois.

L'absorbance d'une solution d'un corps gras à la concentration de 1g pour 100 ml, mesurée en utilisant un parcours optique de 1 cm, à une longueur d'onde λ , est souvent exprimée de la façon suivante :

$$E = A(\lambda)/c$$

$A(\lambda)$: absorbance à la longueur d'onde λ (nm).

c: concentration, en gramme pour 100 mL, de l'échantillon pour essai dans la solution d'essai.

Dans cette expérience, nous avons utilisé un échantillon de 5 mg dans 5 ml d'éthanol, soit une concentration $c=0,1$. Par la suite, l'absorbance étudiée sera A.

Cette méthode est sensible, simple et ne dépend pas de réactions chimiques. Comme pour l'indice de peroxyde, on décrit des limites et des causes d'erreur à ce procédé.

Limites :

- il faut noter que certains corps gras possèdent naturellement des triènes conjugués, par conséquent l'absorbance à 268/270 n'est plus spécifique des produits formés secondairement par l'oxydation.

Causes d'erreur :

- défaut de manipulation : il est absolument nécessaire de nettoyer et de rincer soigneusement les cuves afin qu'il n'y ait aucune impureté et d'étalonner le spectromètre.

Pour ces deux techniques, il faut souligner le fait que l'on obtient une quantité de peroxydes ou de produits dérivés rapportée à la quantité de matière grasse. Ainsi deux aliments avec un indice de peroxydes identique peuvent contenir tout de même une quantité différente de peroxydes proportionnelle à la quantité de matière grasse de l'aliment.

II.4. Présentation des résultats

Dans un but pratique, nous avons pour chaque échantillon créé une fiche descriptive comprenant ses caractéristiques et les résultats obtenus.

Nous avons donc relevé pour chaque produit son nom, sa composition et sa date limite de consommation (DLC). Puis nous avons indiqué les valeurs utiles à retenir au cours de l'expérimentation, et ainsi nous avons pu noter les résultats d'indice de peroxyde (IP) et d'absorbances.

Ces résultats ont tous été notés et répertoriés selon le modèle suivant:

Date :

Marque :

Type :

Lot :

DLC :

% MG (%MB) :

Poids de l'échantillon (g) :

Poids ballon initial	Poids ballon après extraction	
	Poids ballon après prélèvement pour spectro	Poids MG (g)

Absorbance au spectrophotomètre :

Diènes conjugués	Triènes conjugués
234 nm	270 nm

Dosage des peroxydes avec thiosulfate de sodium (0.005 N) :

Quantité de thiosulfate jusqu'à disparition de la couleur bleue (ml) :

Calcul de l'indice de peroxydes :

$$I = (S \times N \times 1000) / (g \text{ d'échantillon})$$

I=

Chaque échantillon a été testé trois fois. Les valeurs aberrantes ont été éliminées et l'indice conservé correspond à la moyenne des valeurs restantes.

Les résultats complets sont présentés p. 48 et 58.

A deux reprises aucun résultat n'a pu être obtenu.

Tout d'abord, l'échantillon n°18 a donné une valeur d'IP mais le spectromètre n'a pas pu mesurer les absorbances même après plusieurs dilutions. Les résultats sont donc incomplets pour cet aliment.

De plus, l'échantillon n°21 n'a pas pu être titré: la séparation de phases ne s'est pas produite malgré plusieurs tentatives.

Dans ces deux cas, aucune explication n'a été trouvée ; les aliments n'avaient subi aucune détérioration particulière et ne laissaient apparaître aucune modification sensorielle.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie, nous allons donner et interpréter les résultats de l'expérimentation précédente. Au cours de cette étude préliminaire, nous avons cherché en fonction de quels paramètres l'oxydation des matières grasses (c'est à dire les mesures de peroxydes et de diènes ou triènes conjugués) variait. Selon la forme et l'espèce destinataire des aliments choisis, la composition des aliments diffère, et notamment leur teneur en matières grasses. Il sera donc intéressant de voir si leur teneur en produits oxydés est aussi différente.

Compte tenu de la difficulté à apprécier l'oxydation d'un produit, il faudra tenir compte dans notre interprétation de la diversité des produits oxydés et des autres facteurs possibles intervenant dans le rancissement.

Nous présenterons les résultats obtenus pour les indices de peroxydes en premier lieu et nous nous intéresserons aux dérivés conjugués par la suite.

III.1. Etude des résultats IP

Le point essentiel de cette thèse est donc d'évaluer et d'analyser les indices de peroxydes dans un certain nombre d'aliments secs et humides pour chiens et chats, d'extrapoler nos résultats à des populations entières et de prévoir l'évolution et les variations de cet indice de peroxyde.

Les résultats de cette expérimentation ont donné un indice de peroxyde moyen de 11,9 meq/kg MG pour la forme sèche (taux MG moyen (%MB) = 16) et un indice moyen de 4,4 pour la forme humide (taux MG moyen = 7,3).

Les aliment plus riches en matières grasses semblent donc susceptibles de s'oxyder beaucoup plus que les autres mais la suite de l'étude va tenter de montrer comment évolue précisément cet indice selon le type d'aliment et son taux de matières grasses .

III.1.1. Résultats IP

Aliments secs	%MG (%MB)	IP (meq/kg MG)
•Chiens		
échantillon n°1: croissance	17,8	8,5
échantillon n°2: maintenance	14,2	7,7
échantillon n°3: senior	9,7	14
échantillon n°4: light	6,3	21,9
échantillon n°5: maintenance	16	8
échantillon n°6: maintenance	16	7
échantillon n°7: croissance	20	4,4
échantillon n°8: croissance	14	3,4
échantillon n°9: croissance	20	4
échantillon n°10: maintenance	12	10
échantillon n°11: croissance	20	4
échantillon n°12: croissance	18	6,4
échantillon n°13: maintenance	16	4,8
échantillon n°14: senior	10	38
échantillon n°15: light	10	55
•Chats		
échantillon n°16: croissance	24,8	2
échantillon n°17: maintenance	21,3	18
échantillon n°18: senior	14,8	1,1
échantillon n°19: light	8,2	18
échantillon n°20: croissance	20	5
échantillon n°21: maintenance	22	non déterminé
échantillon n°22: senior	23	7
échantillon n°23: light	10	9,3
échantillon n°24: maintenance	21	10
échantillon n°25: light	14	19
Aliments humides	%MG (%MB)	IP (meq/kg MG)
•Chiens		
échantillon n°26: light	1,7	20
échantillon n°27: maintenance	7,6	4,2
échantillon n°28: maintenance	6,5	0,6
échantillon n°29: maintenance	4,9	6,8
échantillon n°30: maintenance	3,2	7,1
échantillon n°31: junior	7,6	0,9
•Chats		
échantillon n°32: junior	10,8	0,6
échantillon n°33: maintenance	8,5	1,1
échantillon n°34: maintenance	8,2	3,6
échantillon n°35: maintenance	11,5	0,7
échantillon n°36: maintenance	10	3,2

résultats IP obtenus pour les aliments chien et chat

IP (meq/kg MG)

chien

chat

Aliment	IP (meq/kg MG)
chien	3
chien	4
chien	4
chien	5
chien	5
chien	6
chien	7
chien	7
chien	8
chien	8
chien	9
chien	10
chien	14
chien	19
chien	38
chien	55
chat	1
chat	1
chat	2
chat	2
chat	2
chat	3
chat	3
chat	4
chat	4
chat	5
chat	6
chat	7
chat	8
chat	9
chat	10
chat	18
chat	18
chat	19

Dans la suite de notre étude, nous allons étudier l'influence de divers paramètres sur les valeurs d'IP : espèce cible, type, et taux de matières grasses des aliments. Nous ne nous intéresserons pas à l'impact de l'objectif physiologique ou pathologique des aliments ni au statut de l'animal auxquels ils s'adressent. En effet, nous ne disposons pas d'une quantité suffisante d'échantillons pour certaines catégories et donc nous ne pouvons pas conclure à des différences statistiquement significatives.

Au cours de notre expérimentation, nous avons obtenu 21 valeurs d'indice de peroxyde pour les aliments destinés aux chiens et 14 pour les aliments destinés aux chats. Ces résultats ont été illustrés sur la figure précédente.

A partir de notre échantillonnage, nous avons calculé les paramètres utiles de chaque panel pour ensuite estimer ceux de chaque population et ainsi les comparer :



aliments, qu'ils soient à visée canine ou féline (respectivement 76% et 78,5%), ont un taux de peroxydes inférieur ou égal à 10 meq/kg MG.

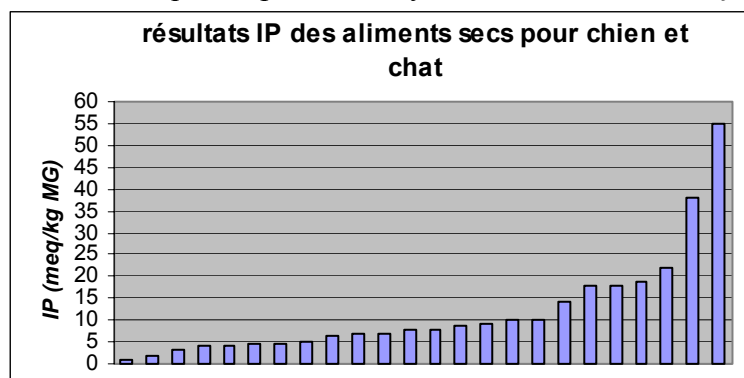
Pour comparer ces deux populations d'aliments à partir de nos deux échantillons prélevés indépendamment, nous avons effectué une comparaison de variances (test de Fisher): il s'est avéré qu'elles étaient significativement différentes au risque 5% ($p < 0,05$ sur notre logiciel). Faute de pouvoir utiliser le test de Student pour comparer leur moyenne, nous avons donc construit un test d'Aspin-Welch qui utilise une variable de décision T qui suit une loi pouvant être approchée par une loi de Student. Avec un degré de liberté de 31 et avec un risque de 5%, nous avons pu conserver notre hypothèse : les moyennes de nos populations ne sont pas significativement différentes ($T = 1,26 < 2,04$), et nous avons conclu que ces deux populations étaient donc au moins partiellement comparables.

III.1.3. Indice de peroxyde et type d'aliments

Nous avons testé 25 aliments sous forme de croquettes et 11 sous forme de boîtes de conserve. Dans un premier temps, nous avons étudié les résultats d'indice de peroxydes pour l'alimentation sèche, puis dans un second temps ceux pour l'alimentation humide avant de comparer ces deux populations.

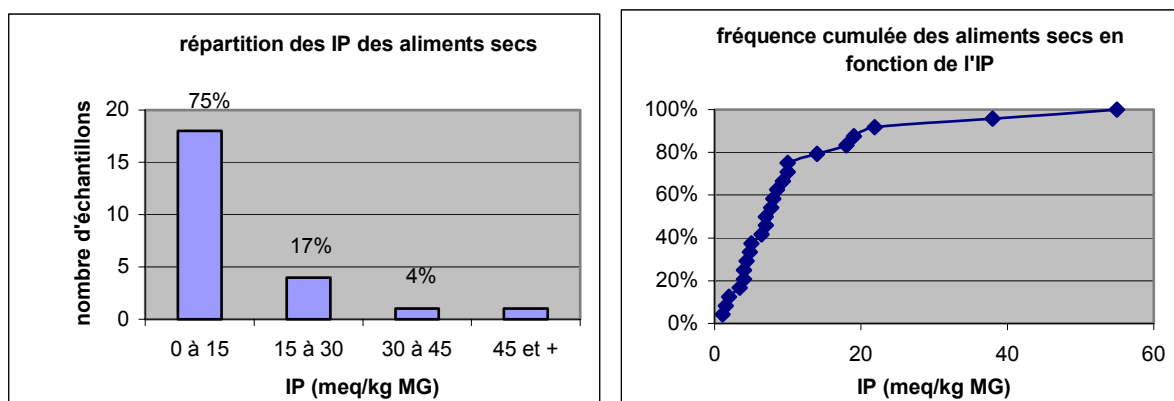
III.1.3.1. Alimentation sèche

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme suivant, les valeurs des 24 échantillons qui ont pu être analysés étant classées de façon croissante :



La moyenne IP de cette population est de 11,9 meq/kg MG avec un écart-type de 12,3. Il faut là encore noter que l'écart-type est très important, ce qui implique que la population est très dispersée autour de la valeur moyenne. Avec un indice moyen de peroxyde bien > 10 meq/kg MG, on peut estimer que cet échantillonnage doit contenir des aliments fortement rances. Ceci s'explique notamment par les valeurs obtenues pour les produits 22 et 23. Si on exclut ces valeurs de notre étude statistique, l'écart-type passe alors à 5,7 ; par conséquent la dispersion devient beaucoup moins importante.

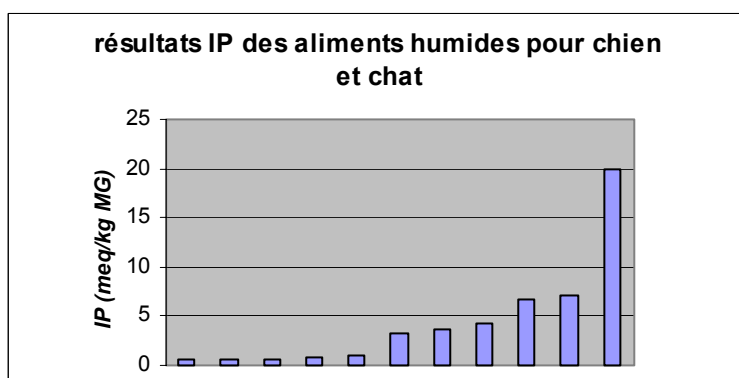
Pour illustrer cette notion, nous avons trié les résultats en se basant sur la médiane et les quartiles de cet échantillonnage : ainsi, 25% des valeurs sont comprises successivement entre (0;4,7), (4,7;7,9), (7,9;15) et (15;55). On s'aperçoit aisément que, pour une même proportion de valeurs, les IP peuvent être très éloignés dans le dernier quart. Il est donc beaucoup plus fréquent d'obtenir un indice IP dans les 15 premiers milliéquivalents que dans les suivants comme le représentent l'histogramme et la courbe suivants :



L'analyse de ces résultats montre que 87,5% des échantillons présentent un indice inférieur ou égal à 20 meq/kg MG et 70,8% un indice inférieur ou égal à 10 meq/kg MG ce qui signifie que la plupart de ces aliments ont tout de même un indice compris dans les valeurs usuelles (soit 1 à 10 meq/kg MG). Si le goût de rance apparaît à partir de 10 meq/kg MG, seuls 7 aliments dépassent cette valeur seuil et seuls ces échantillons auraient donc subi une oxydation suffisamment importante pour provoquer une altération sensorielle et gustative liée à la présence de peroxydes.

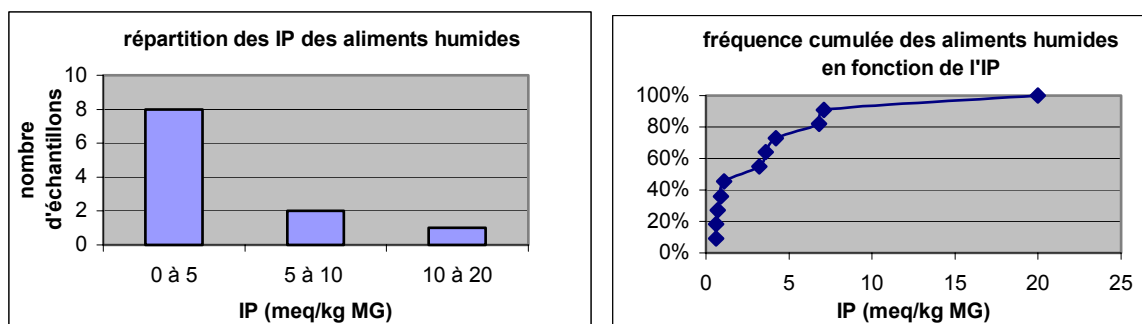
III.1.3.2. Alimentation humide

La même démarche d'analyse a été utilisée pour les aliments sous formes de conserves qu'ils soient destinés aux chiens ou aux chats. Dans la figure suivante apparaissent tous les résultats de notre panel classés de façon croissante :



Pour cette population « humide », nous avons obtenu un IP moyen de 4,4 meq/kg MG avec un écart-type de 5,7. De même que pour les échantillons sous forme sèche, l'écart-type est important et même supérieur à la valeur moyenne; ce qui signifie que cette population est assez dispersée. Cependant, en moyenne, l'IP est largement plus faible dans les conserves (avec un taux de MG plus bas) que dans les aliments secs.

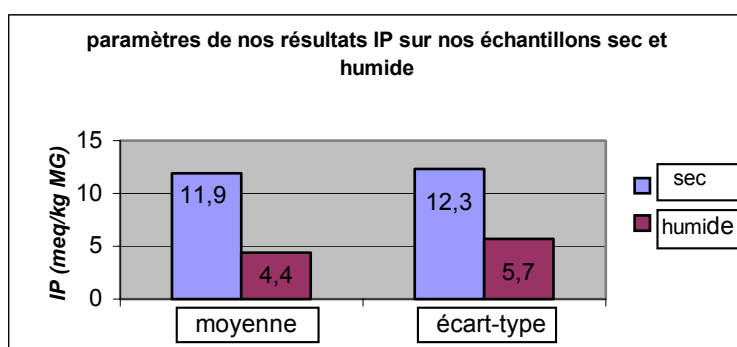
Pour illustrer la répartition de ces valeurs, nous avons réalisé les graphiques suivants.



Dans cet échantillonnage, il faut retenir que l'IP moyen est inférieur à la valeur limite de 10 meq/kg. La majorité des échantillons (plus de 90% des boîtes testées) ont un indice inférieur à 10 meq/kg. En effet, seul 1 échantillon a un indice supérieur à 10 et donc une fort probable altération gustative. On peut même comptabiliser 8 échantillons sur 11 qui ont une valeur inférieure à 5 meq/kg (soit 72,7% de la population) donc une quantité de peroxydes faible, ces peroxydes ne pouvant pas être à l'origine d'un goût rance. Soit ils n'ont pas subi de forte dégradation oxydative, soit ils ont dépassé cette première étape et ont déjà formé des produits secondaires (ces derniers pouvant aussi être à l'origine d'un changement sensoriel).

III.1.3.3. Comparaison des IP en fonction du type d'aliments

Sur le schéma suivant, nous avons fait figurer les paramètres utiles, moyenne et écart-type, de nos 2 échantillons pour tester si les deux populations vues ci-dessus sont identiques :



Dans le but de comparer ces populations, nous avons commencé par effectuer une comparaison de variance selon le test de Fisher qui, grâce à la variable F de décision, nous a permis de conclure à une différence significative de cette caractéristique des populations, avec un risque de 5% ($p < 0,05$ avec notre logiciel). Pour tester l'hypothèse selon laquelle les moyennes des IP des populations, alimentation sèche et alimentation humide, étaient égales ; nous avons fait appel au test d'Aspin-Welch : $T = 2,47$, avec 32 degrés de liberté et un risque de 5%. T étant supérieur à 2,04 (valeur issue des abaques), nous avons rejeté notre hypothèse initiale et admis que ces populations étaient significativement différentes.

Les résultats qui concernent l'alimentation sèche et humide ont donc été analysés séparément par la suite.

III.1.4. Indice de peroxyde et taux de MG

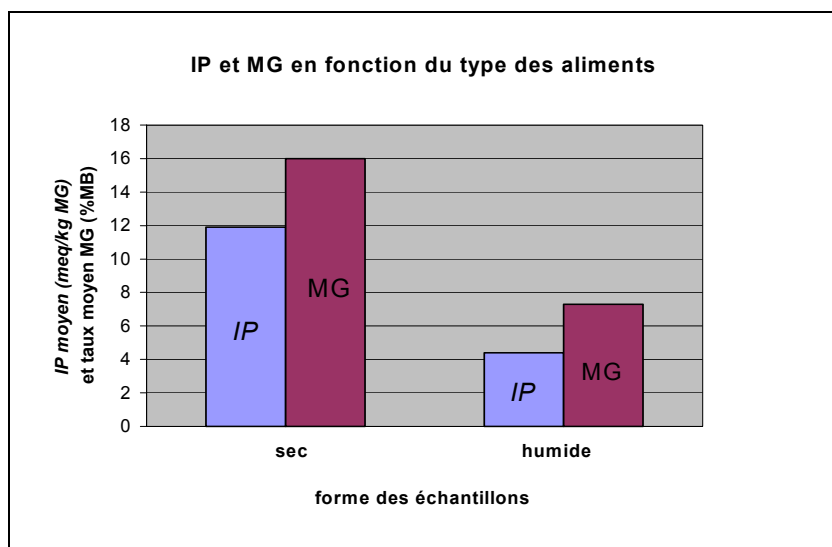
Nous allons maintenant étudier la variation de l'IP en fonction du taux de MG des aliments, facteur connu qui différencie nos échantillons les uns des autres.

Nous rappelons ici que la moyenne des indices de peroxyde des aliments sous forme de croquettes est de 11,9 meq/kg MG, aliments dont le taux moyen de MG est approximativement de 16%. De plus, l'échantillonnage est peu dispersé en ce qui concerne les compositions en MG, l'écart-type étant de 5.

Avec un taux de MG beaucoup plus faible (7,3%) pour les aliments humides, nous avons obtenu un IP moyen plus bas (4,4 meq/kg MG).

Dans cette expérimentation, le risque oxydatif semble plus grand si l'aliment est riche en MG : on peut supposer que la réaction en chaîne spécifique de l'oxydation des lipides aura pour effet de donner un IP (par kg de MG) élevé. Et inversement, moins il y a de lipides, plus l'IP a de chances d'être très faible. C'est ce qui semble ressortir, à toute première vue, de la comparaison des 2 populations d'aliments : secs / humides.

L'illustration de cette hypothèse apparaît dans le tableau suivant :

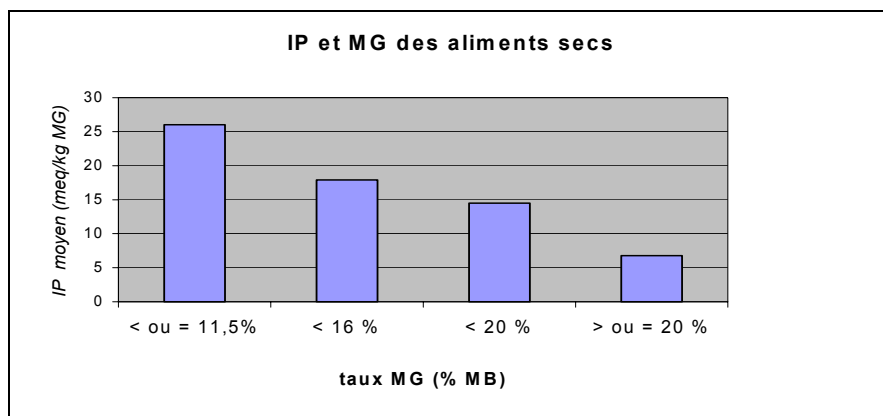


L'étude préliminaire que nous avons menée va tenter de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse et va porter spécifiquement sur chaque type d'aliment.

III.1.4.1. Alimentation sèche

Dans ce paragraphe, nous avons pris en considération le facteur taux de MG de chaque aliment sec, et son influence sur les indices de peroxyde.

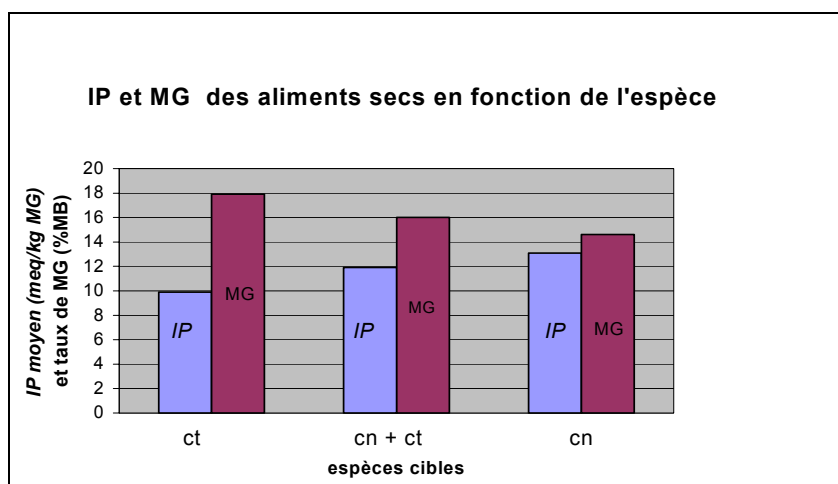
L'échantillonnage correspondant aux aliments secs destinés aux chiens et aux chats a donc été divisé en quartiles en fonction de leur taux de MG, dans le but d'apprécier la répartition de nos résultats IP.



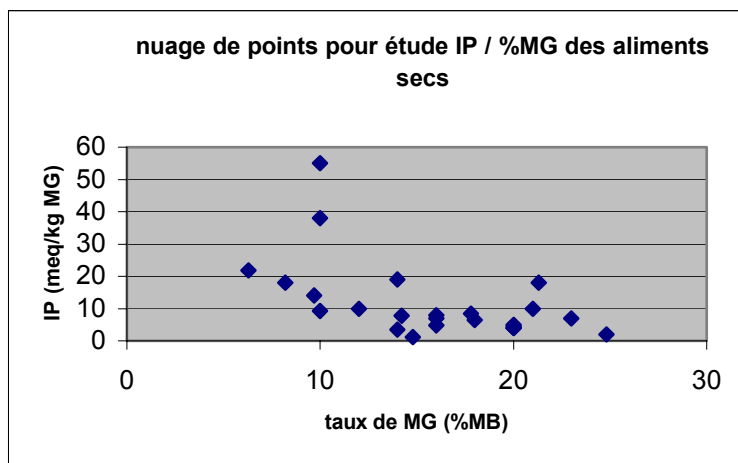
Cette présentation des résultats semble mettre en évidence une relation entre ces deux paramètres. Cette étude préliminaire tend à démontrer que l'indice de peroxyde varie bien en fonction du taux de MG mais que cet indice n'augmente pas avec le taux de MG. Au contraire il semble apparaître que plus le taux de MG est élevé, plus l'indice est faible.

En effet, pour un taux de MG supérieur à 20%, on obtient un IP moyen de 7 et à contrario pour un taux inférieur à 10%, on a un IP moyen de 26 donc un aliment présentant une forte altération oxydative.

Selon l'espèce consommatrice, la moyenne de cet indice de peroxyde varie : il est plus élevé dans les croquettes pour chiens (13,1 meq/kg MG) que celles pour chats (9,9 meq/kg MG). Dans les aliments pour chats, plus riches en MG, l'IP moyen est donc inférieur à celui des aliments secs pour chiens ce qui semble encore confirmer notre hypothèse :



Cependant, on ne saurait prendre cette conclusion comme règle absolue. Le lien existant entre ces 2 paramètres a été approfondi lors d'une étude statistique.



Ce type de graphique permet d'obtenir la représentation des résultats en fonctions des 2 variables étudiées simultanément.

Il apparaît que ce nuage de points semble progresser autour d'une droite précise, plus particulièrement si on exclut les 2 points avec les IP les plus élevés. On peut alors envisager effectivement que les points se situent autour d'une droite dont la pente est négative.

Pour affiner cette hypothèse, nous avons donc cherché à appliquer une régression linéaire entre ces 2 séries de paramètres, c'est à dire que nous avons cherché à prouver qu'il existe une équation mathématique qui nous donnerait une idée de l'IP si on connaissait le taux de MG d'un aliment.

On obtient une pente de $-1,315$ avec notre échantillonnage complet, pente significative ($p=0,007$). Le fait que ce coefficient soit négatif montre que ces paramètres varient bien de façon inverse, c'est à dire que, dans notre panel, si le taux de MG d'un aliment sec augmente, l'IP diminue. Plus précisément l'équation mathématique pour évaluer l'IP en fonction du taux de MG est la suivante :

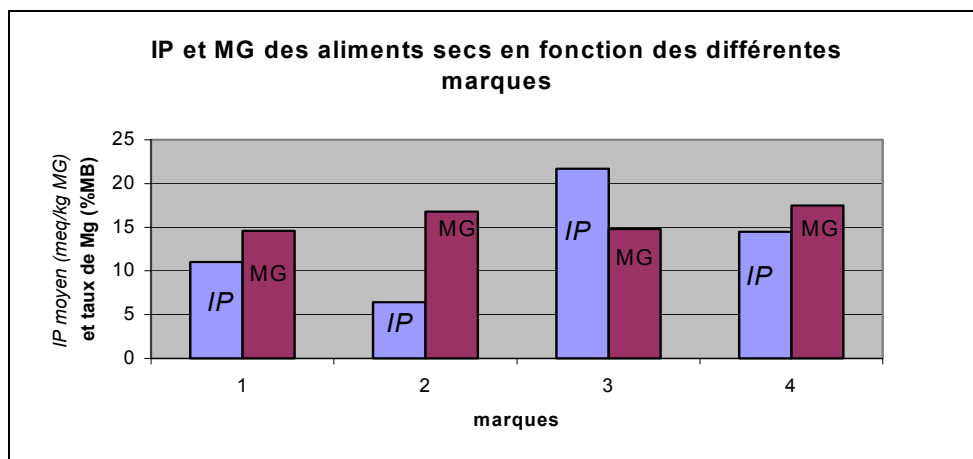
$IP = (\text{ordonnée à l'origine soit } 32,597) - 1,315 \times MG$.

Le coefficient de détermination r^2 est égal à $0,289$ soit $28,9\%$. Nous pouvons déduire que seulement 30% des variations d'indice de peroxydes s'explique par les variations du taux de MG.

Ainsi dans notre échantillonnage, plus le taux de matière grasse d'un aliment sec sera élevé, plus son IP sera faible même si cette relation ne semble pas très forte.

Pour une ration identique, il apparaît donc qu'un animal n'ingérera pas forcément plus de peroxydes si l'aliment est riche en matière grasse. L'hypothèse d'une meilleure qualité des matières premières et la garantie de leur stabilisation dans les aliments enrichis en MG semble donc tout primordiale et véridique dans notre échantillonnage.

Sont maintenant exposés les résultats obtenus en fonction des différentes marques d'aliments secs testés. Sur les diagrammes suivants, l'IP est associé au taux de MG, paramètre qui retient notre attention.



Ces résultats ne peuvent être en aucun cas considérés comme représentatifs d'une marque ; en effet, il eut fallu un nombre plus important de références pour chacune et plusieurs produits d'une même référence pour que les IP soient statistiquement interprétables.

Mais en comparant ces divers groupes, il semble que l'IP ne varie pas en fonction de la teneur en MG. On peut constater que pour un taux de MG presque identique, IP 1 est largement inférieur à IP 3. Pour les aliments secs dont le taux de MG est le plus élevé, IP 4 ne s'avère pas être le plus faible.

Si le taux de MG influe sur l'IP, il apparaît néanmoins une nette variation entre ces dernières catégories et par conséquent on peut supposer que d'autres facteurs interviennent, et notamment la qualité des matières grasses choisies, les autres composants,...(le traitement de ces produits, la méthode et la durée de conservation pour ce type d'aliments étant similaires) sur la peroxydation lipidique.

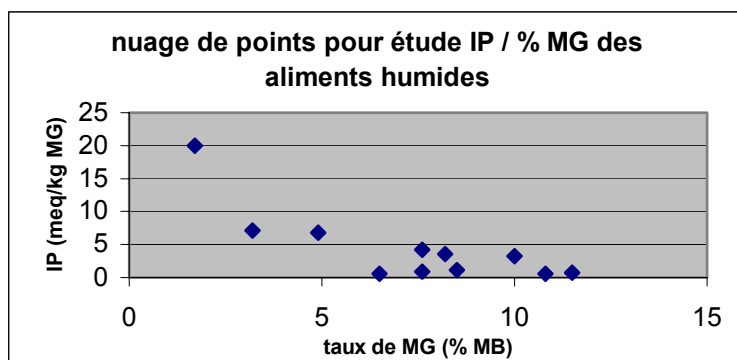
III.1.4.2. Alimentation humide

Nous avons ensuite étudié l'importance du facteur taux de MG sur les produits sous forme de conserves.

Comme nous l'avons vu plutôt, les aliments humides ont un taux moyen de MG aux environs de 7,3% de la MB et un écart-type de 3. Cette matière grasse varie d'un échantillon à l'autre de 1,7% à 11,5% selon le destinataire et l'espèce cible.

A priori, il apparaît encore une nette diminution de l'IP moyen au fur et à mesure que le taux de MG des aliments augmente. En effet, pour un taux de MG < 5%, on a un indice IP moyen supérieur à 11 alors que pour un taux de MG > 10%, on obtient un IP moyen de 1,5.

Pour visualiser cette corrélation inverse, nous avons également étudié statistiquement ces données. Comme pour les aliments sous forme de croquettes, nous avons représenté cette notion par un nuage de points, ce qui permet d'analyser notre alimentation selon les 2 caractéristiques sélectionnées :

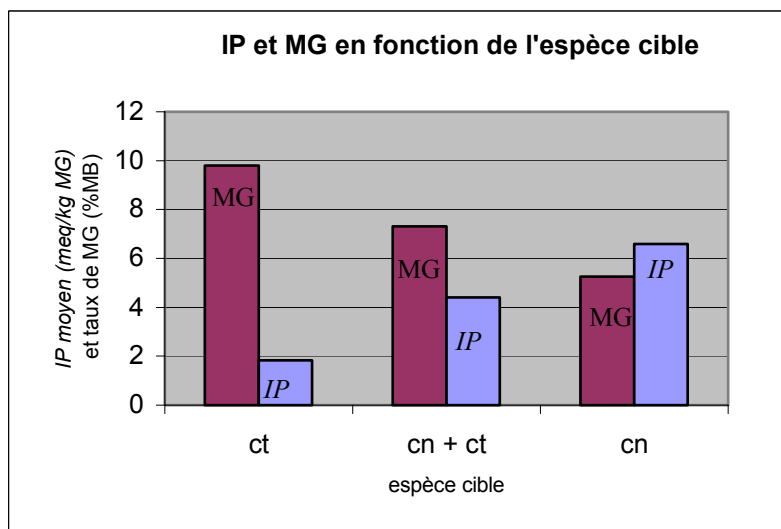


Ces points semblent aussi se regrouper autour d'une même ligne droite décroissante. Ce lien va être exprimé par régression linéaire. La pente a donc été calculée et $C = -1,47$. Ce coefficient distinct de 0 et significatif ($p = 0,003$) confirme le lien certain unissant les 2 paramètres IP et MG. De plus $r^2 = 63\%$ ce qui renforce l'adéquation de la variation de ces 2 paramètres.

Dans cet échantillonnage, IP et MG varient donc de façon opposée : lorsque le taux de MG des aliments humides testés augmente, l'IP diminue et inversement si le taux de MG diminue, l'IP augmente.

Ainsi, pour les aliments secs comme pour les aliments humides étudiés, cette étude préliminaire tend à prouver que pour un taux de MG connu, on peut approcher celui de peroxydes et que cet indice diminue lorsque le taux de MG augmente.

Nous pouvons illustrer ce phénomène par l'analyse de la variation du taux de MG en fonction de l'espèce cible. En effet, dans les aliments secs ou humides destinés aux chats, le taux de MG est supérieur à ceux destinés aux chiens.



En conclusion, parmi les produits testés de cette étude préliminaire, plus les matières grasses sont en grande quantité, plus l'aliment est pauvre en peroxydes par kilogramme de MG.

Les aliments senior ou light sont en général moins riches en MG que les gammes adultes ou à fortiori junior. Il est donc intéressant de noter que l'IP serait plus élevé pour ces

aliments qui sont destinés à des animaux en général plus sensibles et fragilisés donc avec un risque accru de pathologies cancéreuses ou vasculaires. On comprend alors l'utilité de diminuer un maximum le taux de MG de ces aliments, d'en modifier la qualité et/ou d'ajouter des antioxydants.

III.2. Pourquoi avoir utilisé l'absorbance UV ?

L'indice de peroxyde a donc été étudié et analysé en fonction de divers facteurs. Cet indice reflète l'état d'oxydation des matières grasses, mais seulement sa première étape. Un aliment peut présenter un indice de peroxyde faible alors que l'oxydation des matières grasses a justement été importante et a entraîné la transformation de ces peroxydes en diènes et triènes, eux aussi témoins capitaux de l'état d'oxydation et d'altération sensorielle d'un aliment. C'est pourquoi afin d'évaluer l'état oxydatif le plus complet possible des matières grasses, nous avons souhaité apprécier les taux de diènes et triènes conjugués présents dans nos échantillons.

III.2.1. Résultats

Comme cela a été énoncé avant, les diènes absorbent à 234 nm et les triènes à 270 nm. La liste des résultats est la suivante :

Echantillon	IP(meq/kg MG)	abs234nm	abs270nm
•Aliments secs chiens et chats			
échantillon n°1	8,5	1	0,1
échantillon n°2	7,7	0,7	0,2
échantillon n°3	14	1,1	0,3
échantillon n°4	21,9	0,6	0,2
échantillon n°5	8	1,1	0,2
échantillon n°6	7	0,8	0,2
échantillon n°7	4,4	0,9	0,2
échantillon n°8	3,4	8	1,7
échantillon n°9	4	0,6	0,1
échantillon n°10	10	0,7	0,1
échantillon n°11	4	0,8	0,2
échantillon n°12	6,4	0,6	0,1
échantillon n°13	4,8	0,8	0,1
échantillon n°14	38	1	0,2
échantillon n°15	55	2,6	0,8
échantillon n°16	2	0,6	0,1
échantillon n°17	18	1,3	0,3
échantillon n°18	1,1	non déterminés	
échantillon n°19	18	1,5	0,5
échantillon n°20	5	1,2	0,4
échantillon n°21	non déterminés		
échantillon n°22	7	0,9	0,3
échantillon n°23	9,3	0,6	0,2
échantillon n°24	10	0,8	0,2
échantillon n°25	19	0,9	0,3

•Aliments humides chiens et chats

échantillon n°26	20	0,5	0,2
échantillon n°27	4,2	0,3	0,04
échantillon n°28	0,6	0,5	0,07
échantillon n°29	6,8	0,3	0,08
échantillon n°30	7,1	0,3	0,1
échantillon n°31	0,9	0,4	0,09
échantillon n°32	0,6	0,4	0,08
échantillon n°33	1,1	0,4	0,06
échantillon n°34	3,6	0,8	0,1
échantillon n°35	0,7	0,3	0,04
échantillon n°36	3,2	0,4	0,08

III.2.2. Interprétation et limites du dosage des diènes et triènes

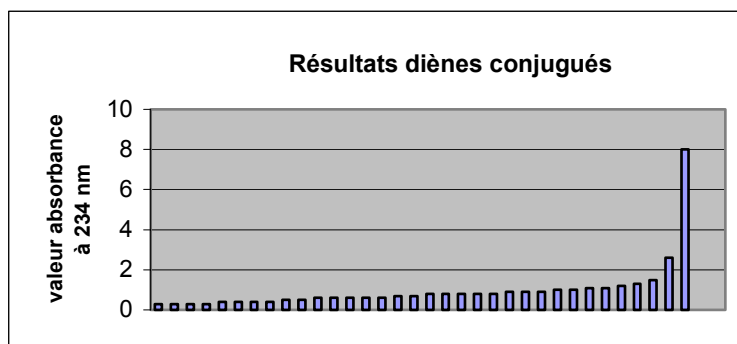
Comme pour l'étude des résultats des indices de peroxyde, nous avons analysé nos valeurs sur les échantillons et les populations correspondantes, les avons comparé et voulu voir leur variation en fonction des mêmes critères relatés auparavant.

III.2.2.1. Analyse des résultats

Nous présenterons d'abord les résultats des diènes obtenus puis les résultats des triènes conjugués.

III.2.2.1.1. Diènes conjugués

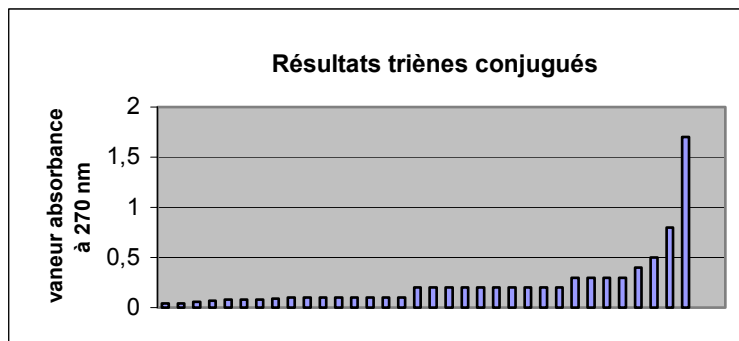
Cette figure présente les résultats obtenus pour les diènes conjugués :



Ainsi sans considération pour le type d'aliments ou l'espèce destinataire, nous obtenons une absorbance moyenne $m=0,99$ et un écart-type $s=1,315$ pour nos 34 échantillons dont les valeurs sont comprises entre (0,3;8). Plus de 75% de nos valeurs se situent entre (0,3 et 1). L'écart-type est plus élevé que la valeur moyenne, mais cette valeur est intrinsèquement assez basse.

III.2.2.1.2. Triènes conjugués

Sur notre échantillonnage complet, l'absorbance moyenne des triènes est de $m=0,234$ avec $s=0,3$ et les valeurs s'étalent de 0,1 à 1,7. Deux aliments uniquement ont une valeur supérieure à 0,5. Nos produits absorbent en moyenne moins à 270 qu'à 234 nm.



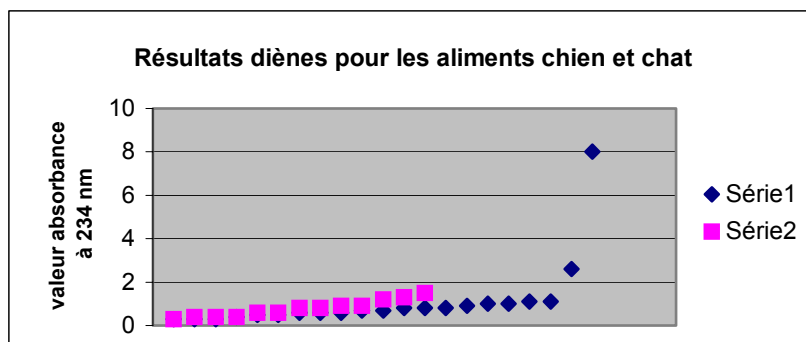
III.2.2.2. Produits conjugués et espèce destinataire

Comme pour l'étude des peroxydes, nous avons voulu savoir si, en fonction des résultats obtenus pour nos produits conjugués sur nos échantillons, nous pouvions comparer les deux populations que sont les aliments destinés aux chiens d'une part et ceux destinés aux chats d'autre part. Nous avons interprété les résultats des diènes puis continué avec ceux des triènes.

III.2.2.2.1. Diènes conjugués

Les tests de comparaison appliqués à ces échantillons tentent de prouver si les deux populations sont identiques. Pour cela, nous allons tester l'hypothèse selon laquelle la moyenne en diènes de ces deux populations sont équivalentes.

Nous avons récapitulé ci-après nos résultats et les paramètres dont nous avons besoin :



Aliments chien (Série 1)	n=21	m=1,12	s=1,65
Aliments chat (Série 2)	n=13	m=0,78	s=0,28

Grâce au test de Fisher, nous avons conclu à une différence significative des variances au risque 5% ($F>3$). Nous avons construit ensuite un test d'Aspin-Welch sur la base de T avec 23 degrés de liberté et avec un risque de 5% : $T = 0,928 < 2,069$.

Par conséquent comme pour les IP, nous avons gardé notre hypothèse de départ et conclu que nos populations chiens et chats étaient similaires.

Résultats triènes pour les aliments chien et chats

Le graphique est un diagramme à dispersion. L'axe des ordonnées est étiqueté 'valeur absorbance à 270 nm' et va de 0 à 2. L'axe des abscisses est également étiqueté 'valeur absorbance à 270 nm' et va de 0 à 2. La légende à droite indique 'Série1' (losange bleu) et 'Série2' (carré rose).

Les données de la Série1 (aliments chiens) sont les suivantes :

valeur absorbance à 270 nm (x)	valeur absorbance à 270 nm (y)
0.1	0.1
0.2	0.1
0.3	0.1
0.4	0.1
0.5	0.1
0.6	0.1
0.7	0.1
0.8	0.1
0.9	0.1
1.0	0.1
1.1	0.1
1.2	0.1
1.3	0.1
1.4	0.1
1.5	0.1
1.6	0.1
1.7	0.1
1.8	0.1
1.9	0.1
2.0	0.1
2.1	0.1
2.2	0.1
2.3	0.1
2.4	0.1
2.5	0.1
2.6	0.1
2.7	0.1
2.8	0.1
2.9	0.1
3.0	0.1
3.1	0.1
3.2	0.1
3.3	0.1
3.4	0.1
3.5	0.1
3.6	0.1
3.7	0.1
3.8	0.1
3.9	0.1
4.0	0.1
4.1	0.1
4.2	0.1
4.3	0.1
4.4	0.1
4.5	0.1
4.6	0.1
4.7	0.1
4.8	0.1
4.9	0.1
5.0	0.1
5.1	0.1
5.2	0.1
5.3	0.1
5.4	0.1
5.5	0.1
5.6	0.1
5.7	0.1
5.8	0.1
5.9	0.1
6.0	0.1
6.1	0.1
6.2	0.1
6.3	0.1
6.4	0.1
6.5	0.1
6.6	0.1
6.7	0.1
6.8	0.1
6.9	0.1
7.0	0.1
7.1	0.1
7.2	0.1
7.3	0.1
7.4	0.1
7.5	0.1
7.6	0.1
7.7	0.1
7.8	0.1
7.9	0.1
8.0	0.1
8.1	0.1
8.2	0.1
8.3	0.1
8.4	0.1
8.5	0.1
8.6	0.1
8.7	0.1
8.8	0.1
8.9	0.1
9.0	0.1
9.1	0.1
9.2	0.1
9.3	0.1
9.4	0.1
9.5	0.1
9.6	0.1
9.7	0.1
9.8	0.1
9.9	0.1
10.0	0.1
10.1	0.1
10.2	0.1
10.3	0.1
10.4	0.1
10.5	0.1
10.6	0.1
10.7	0.1
10.8	0.1
10.9	0.1
11.0	0.1
11.1	0.1
11.2	0.1
11.3	0.1
11.4	0.1
11.5	0.1
11.6	0.1
11.7	0.1
11.8	0.1
11.9	0.1
12.0	0.1
12.1	0.1
12.2	0.1
12.3	0.1
12.4	0.1
12.5	0.1
12.6	0.1
12.7	0.1
12.8	0.1
12.9	0.1
13.0	0.1
13.1	0.1
13.2	0.1
13.3	0.1
13.4	0.1
13.5	0.1
13.6	0.1
13.7	0.1
13.8	0.1
13.9	0.1
14.0	0.1
14.1	0.1
14.2	0.1
14.3	0.1
14.4	0.1
14.5	0.1
14.6	0.1
14.7	0.1
14.8	0.1
14.9	0.1
15.0	0.1
15.1	0.1
15.2	0.1
15.3	0.1
15.4	0.1
15.5	0.1
15.6	0.1
15.7	0.1
15.8	0.1
15.9	0.1
16.0	0.1
16.1	0.1
16.2	0.1
16.3	0.1
16.4	0.1
16.5	0.1
16.6	0.1
16.7	0.1
16.8	0.1
16.9	0.1
17.0	0.1
17.1	0.1
17.2	0.1
17.3	0.1
17.4	0.1
17.5	0.1
17.6	0.1
17.7	0.1

Aliments chien (Série 1)	n=21	m=0,25	s=0,367
Aliments chat (Série 2)	n=13	m=0,205	s=0,145

A partir de nos écarts-types, le test de Fisher a permis de rejeter l'hypothèse de deux variances égales au risque 5%. Le test d'Aspin-Welch (test Z) avec 31 degrés de liberté et un risque identique a donné $T = 0,5$ ce qui est inférieur à la valeur donnée par les tables soit 2,04. Comme pour les diènes, nous avons conclu que la moyenne des deux populations n'étaient pas significativement différentes.

L'étude porte ensuite sur la comparaison des diènes dans les populations d'aliments secs et d'aliments humides à partir des résultats trouvés sur nos deux échantillons. Comme au paragraphe précédent, nous étudierons ce phénomène d'abord pour les diènes puis pour les triènes.

Résultats diènes pour les aliments secs et humides

Point	Série1 (valeur absorbance à 234 nm)	Série2 (valeur absorbance à 234 nm)
1	0.5	0.5
2	0.2	0.5
3	0.2	0.5
4	0.2	0.5
5	0.2	0.5
6	0.2	0.5
7	0.2	0.5
8	0.2	0.5
9	0.2	0.5
10	0.2	0.5
11	0.2	0.5
12	0.2	0.5
13	0.2	0.5
14	0.2	0.5
15	0.2	0.5
16	0.5	0.5
17	0.5	0.5
18	0.5	0.5
19	0.5	0.5
20	0.5	0.5
21	0.5	0.5
22	0.5	0.5
23	0.5	0.5
24	0.5	0.5
25	0.5	0.5
26	0.5	0.5
27	0.5	0.5
28	0.5	0.5
29	0.5	0.5
30	0.5	0.5
31	0.5	0.5
32	0.5	0.5
33	0.5	0.5
34	0.5	0.5
35	0.5	0.5
36	0.5	0.5
37	0.5	0.5
38	0.5	0.5
39	0.5	0.5
40	0.5	0.5
41	0.5	0.5
42	0.5	0.5
43	0.5	0.5
44	0.5	0.5
45	0.5	0.5
46	0.5	0.5
47	0.5	0.5
48	0.5	0.5
49	0.5	0.5
50	0.5	0.5
51	0.5	0.5
52	0.5	0.5
53	0.5	0.5
54	0.5	0.5
55	0.5	0.5
56	0.5	0.5
57	0.5	0.5
58	0.5	0.5
59	0.5	0.5
60	0.5	0.5
61	0.5	0.5
62	0.5	0.5
63	0.5	0.5
64	0.5	0.5
65	0.5	0.5
66	0.5	0.5
67	0.5	0.5
68	0.5	0.5
69	0.5	0.5
70	0.5	0.5
71	0.5	0.5
72	0.5	0.5
73	0.5	0.5
74	0.5	0.5
75	0.5	0.5
76	0.5	0.5
77	0.5	0.5
78	0.5	0.5
79	0.5	0.5
80	0.5	0.5
81	0.5	0.5
82	0.5	0.5
83	0.5	0.5
84	0.5	0.5
85	0.5	0.5
86	0.5	0.5
87	0.5	0.5
88	0.5	0.5
89	0.5	0.5
90	0.5	0.5
91	0.5	0.5
92	0.5	0.5
93	0.5	0.5
94	0.5	0.5
95	0.5	0.5
96	0.5	0.5
97	0.5	0.5
98	0.5	0.5
99	0.5	0.5
100	0.5	0.5
101	0.5	0.5
102	0.5	0.5
103	0.5	0.5
104	0.5	0.5
105	0.5	0.5
106	0.5	0.5
107	0.5	0.5
108	0.5	0.5
109	0.5	0.5
110	0.5	0.5
111	0.5	0.5
112	0.5	0.5
113	0.5	0.5
114	0.5	0.5
115	0.5	0.5
116	0.5	0.5
117	0.5	0.5
118	0.5	0.5
119	0.5	0.5
120	0.5	0.5
121	0.5	0.5
122	0.5	0.5
123	0.5	0.5
124	0.5	0.5
125	0.5	0.5
126	0.5	0.5
127	0.5	0.5
128	0.5	0.5
129	0.5	0.5
130	0.5	0.5
131	0.5	0.5
132	0.5	0.5
133	0.5	0.5
134	0.5	0.5
135	0.5	0.5
136	0.5	0.5
137	0.5	0.5
138	0.5	0.5

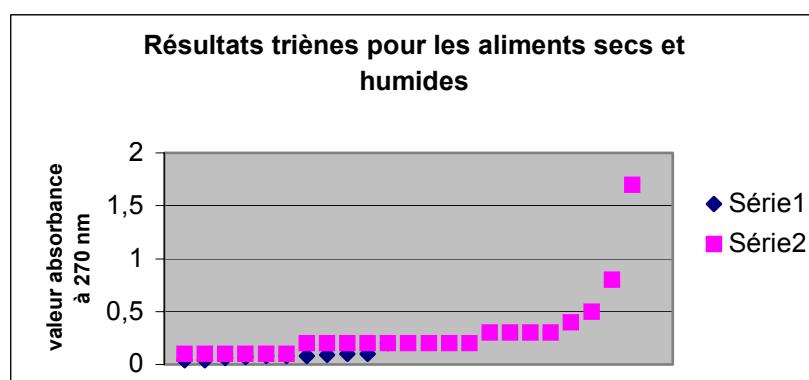
Des méthodes identiques ont été utilisées, nécessitant le calcul des paramètres suivants :

Aliments secs (Série 2)	n=23	m=1,265	s=1,5
Aliments humides (Série 1)	n=11	m=0,418	s=0,14

On peut souligner l'écart qui existe entre ces catégories : le nombre d'échantillons est éloigné, de plus les diènes sont en moyenne beaucoup moins présents dans les aliments humides et y sont peu dispersés.

Au risque toujours de 5%, la variable F est nettement supérieure à la valeur des tables, par conséquent nous avons encore des variances inégales pour ces deux populations. Le test Z avec 25 degrés de liberté et $\alpha=5\%$ a aussi permis de rejeter l'hypothèse de l'égalité des absorbances moyennes des diènes dans ces deux types d'aliments.

III.2.2.3.2. Triènes conjugués



Aliments secs (Série 2)	n=23	m=0,3	s=0,343
Aliments humides (Série 1)	n=11	m=0,085	s=0,043

Là encore, il semble y avoir une nette différence entre nos deux panels : d'après nos résultats, les paramètres précédents sont en effet très éloignés.

100% des résultats obtenus pour l'alimentation sèche égale ou dépasse 0,1 alors que plus de 90% des aliments humides ont une valeur inférieure ou égale à ce seuil.

Pour les triènes, les deux variances se sont révélées inégales avec un risque de 5%. De la même façon que pour les diènes, le test Z a abouti à la même conclusion (degré de liberté =24 et $\alpha=5\%$) avec une valeur T légèrement supérieure à celle des tables.

En somme, ces populations (sèche et humide) sont significativement différentes l'une de l'autre et nos échantillons ne nous permettent pas de les considérer identiques. Encore une fois, les statistiques seront réalisées distinctement sur chaque population définie ici.

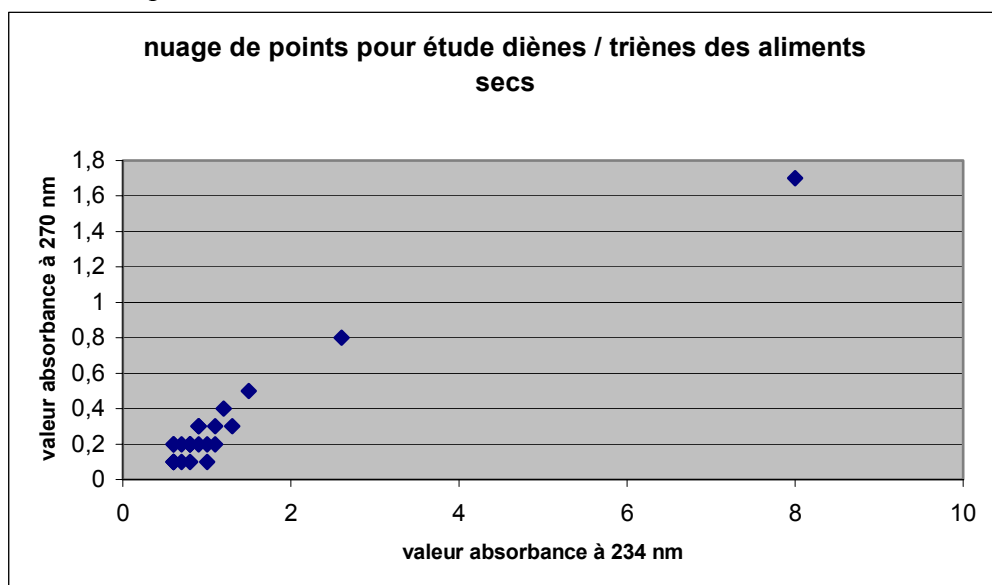
III.2.2.4. Produits conjugués et IP ou MG

Cette étude préliminaire cherche à montrer une corrélation entre la quantité de produits conjugués et celle de peroxydes ou de matières grasses. Lorsque nous avons trouvé auparavant une relation forte entre l'IP et le taux de MG, il suffira ici d'analyser la variation de la quantité de produits secondaires en fonction d'un seul de ceux-ci. La corrélation avec l'autre en découlera directement.

III.2.2.4.1. Aliments secs

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si ces composés secondaires apparaissaient lorsque les peroxydes disparaissaient, c'est à dire si la quantité de diènes et triènes augmentait au fur et à mesure que la quantité de peroxydes diminuait mais aussi si la quantité de diènes augmentait avec celle de triènes dans les échantillons choisis.

Nous avons donc cherché si les valeurs d'absorbance de diènes et de triènes étaient liées statistiquement :

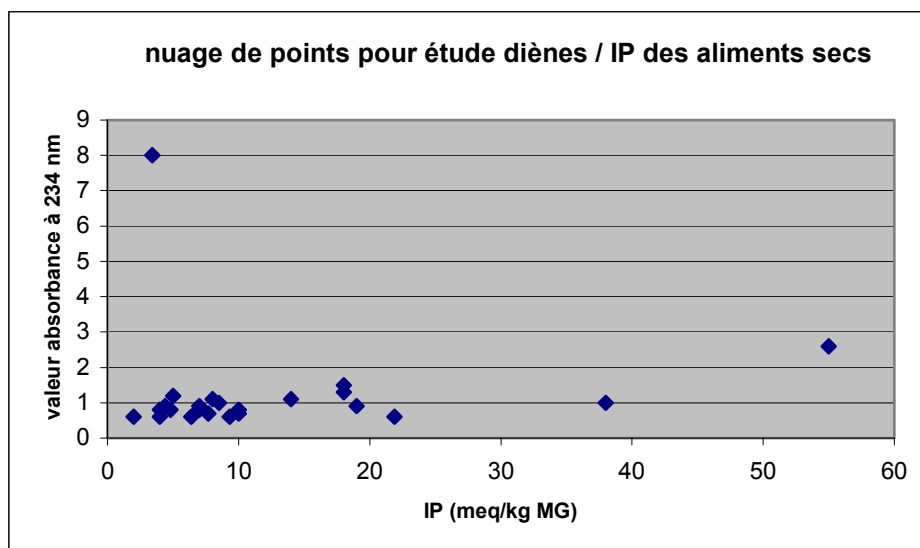


Ces points semblent se regrouper autour d'une même courbe croissante. Pour nos aliments, il semble que les deux critères soient étroitement liés.

La régression linéaire a confirmé cette hypothèse; en effet la pente est de +0,217 et est hautement significative ($p = 0,000$), c'est à dire que ces paramètres augmentent tout à fait de façon concomitante. Ceci apparaît d'autant plus évident avec un $r^2 = 94\%$.

Ces deux paramètres de la population étant complètement corrélés, il suffit qu'un des deux varie avec l'IP ou avec le taux de MG, pour que l'autre le soit aussi.

Nous avons alors choisi d'étudier l'évolution de la quantité de diènes conjugués en fonction de l'indice de peroxyde.

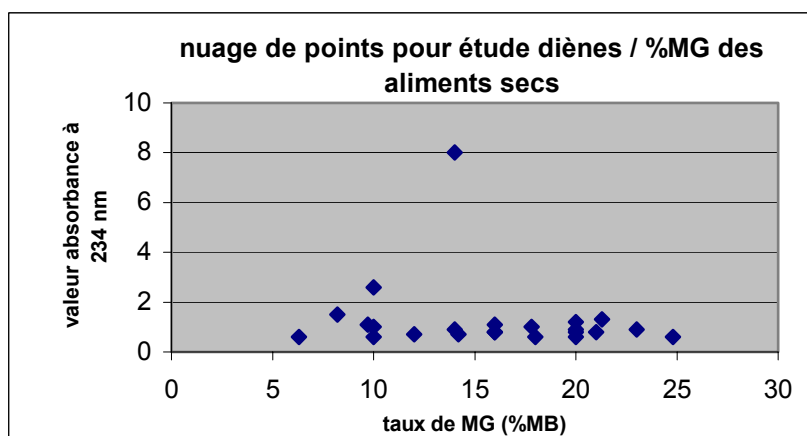


Ce nuage de point ne semble pas répondre à une régression linéaire. En effet, avec une pente de 0,007, $p = 0,804$ et $r^2 = 0,003$, on ne peut pas conclure à un lien entre ces deux caractéristiques. Par conséquent si l'IP est faible, les diènes ou triènes ne sont pas pour autant en nombre plus important sur l'échantillon testé.

On pouvait supposer qu'en fin de date limite de consommation sur tous ces aliments secs et avec des taux de peroxydes importants, il y ait formation de ces composés tandis que les peroxydes se détruisaient. Mais il ne semble pas y avoir de lien statistique pour prévoir la quantité de composés secondaires en fonction de l'IP.

En somme, il faut envisager l'hypothèse que ces aliments testés sont à des stades différents d'oxydation: soit ils n'ont pas subi d'altération oxydative (IP normal sans diènes ni triènes) ou une altération insuffisante (IP élevé sans produits secondaires) pour avoir une importante présence de diène ou triènes; soit il y a effectivement présence de ces produits mais alors l'IP n'est pas lié directement à l'absorbance et pouvait être largement plus élevé quelque temps auparavant.

Pareillement à l'IP, nous avons cherché une corrélation entre la quantité de diènes et le taux de MG des aliments.



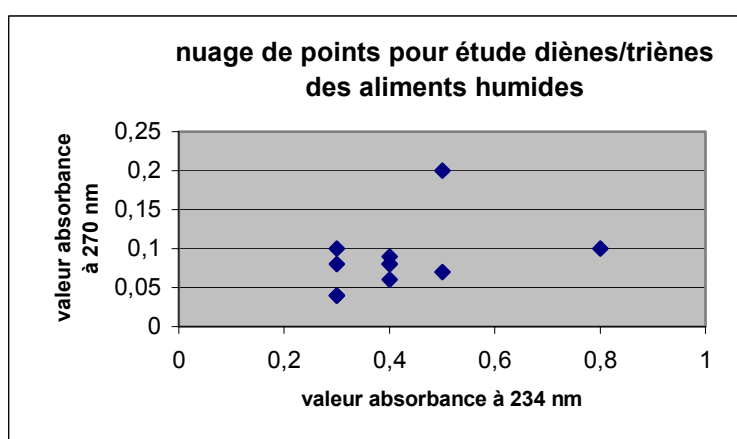
Mais dans notre échantillonnage, aucun lien statistique n'a pu confirmer une relation entre quantité de diènes et quantité de matières grasses. La pente de la droite de régression linéaire calculée est égale à $-0,04$ et elle n'est pas significative ($p = 0,5$). De plus $r^2 = 0,021$ soit 2%, c'est à dire que la relation est très faible entre ces deux paramètres.

Par conséquent, même si un aliment de notre panel a un fort taux de MG ou de peroxydes, il n'y a pas obligatoirement des diènes (et par suite des triènes) en plus grande quantité.

III.2.2.4.2. Aliments humides

Les aliments sous forme de conserves, avec un indice de peroxyde moyen plus bas que les aliments secs, ont donné aussi des taux moyens de diènes et triènes plus faibles. Nous allons donc tenter d'estimer si la quantité de diènes ou triènes évoluent de façon similaire avec la quantité de peroxydes, contrairement à notre hypothèse.

Comme précédemment, commençons par étudier les valeurs d'absorbances obtenues à 234 nm pour les diènes et les valeurs d'absorbance à 270 nm pour les triènes :



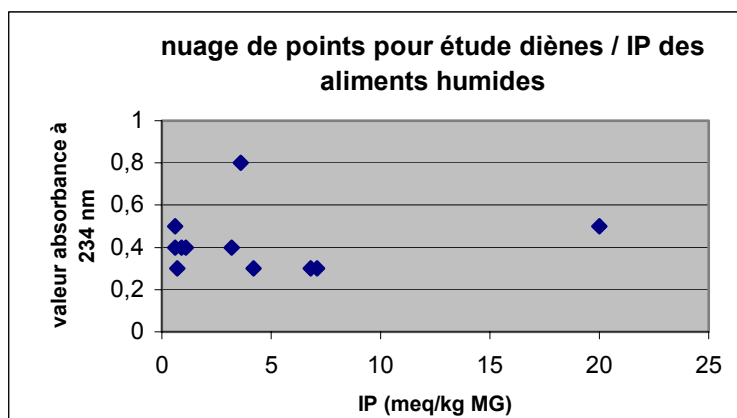
Ce graphique ne semble pas permettre à une droite de relier les différents points. Effectivement, avec une pente de 0,11 non significative ($p = 0,254$) et un coefficient de détermination de 0,141, on peut conclure que ces 2 séries de valeurs n'évoluent pas selon une relation linéaire.

Ainsi, contrairement à ce qui est observé sur les aliments sous forme sèche, la quantité de diènes ne présage en rien de celle de triènes.

Nous avons donc analysé séparément la quantité de diènes et de triènes de ces aliments et leur corrélation éventuelle avec les paramètres IP et taux de MG.

Toutefois, pour cet échantillonnage, nous avons vu que l'IP varie de façon certaine et inverse avec le taux de MG. On peut donc prévoir que si la quantité de diènes ou de triènes dépend de l'IP, elle dépend aussi du taux de MG de nos aliments humides : si l'absorbance à 234 nm (ou celle à 270 nm) augmente avec l'IP, elle diminuera en fonction du taux de MG.

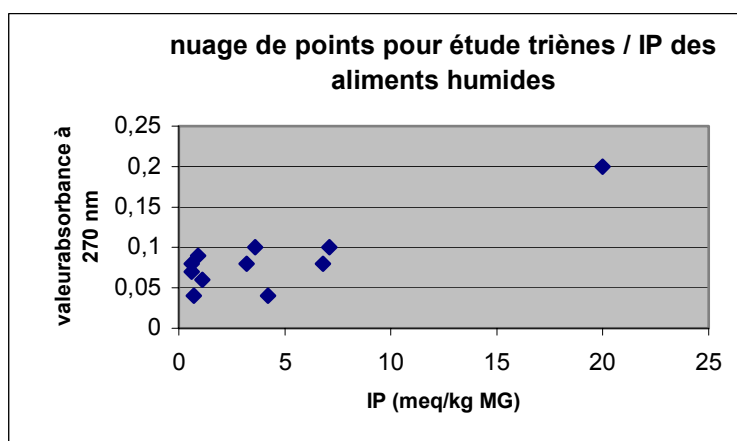
En premier lieu, nous avons cherché si connaissant l'IP d'un aliment, on pouvait présumer d'une valeur de diènes :



Comme le montre ce nuage de points, nous avons conclu à l'absence de lien statistique entre ces deux critères, la pente étant quasi nulle ($C = 0,002$) et très peu significative ($p = 0,798$) et de même que pour les aliments secs r^2 est quasi-nul ($r = 0,008$).

Par suite, nous pouvons conclure à l'absence de lien mathématique entre le taux de diènes et le taux de MG des aliments humides (en effet, l'étude statistique accentue cette absence totale de corrélation : $C = - 0,001$, $p = 0,957$ et $r^2 = 0$).

Dans un second temps, nous avons envisagé l'hypothèse que la quantité de triènes pouvait découler statistiquement de celle de peroxydes:



Les points représentés sur ce graphique semblent évoluer selon une droite précise. La pente semble ici positive. En effet, les 2 critères semblent varier dans le même sens : plus l'IP augmente, plus l'absorbance à 270 nm est importante pour nos données.

La régression linéaire appliquée à ces valeurs nous a donné les informations suivantes : $C = 0,007$, $p = 0,001$ et $r^2 = 0,751$, c'est à dire qu'on a ici des résultats très significatifs avec une pente positive mais relativement faible.

En somme, sur cette série, l'indice de peroxyde permet d'appréhender la teneur en triènes de l'aliment. Si l'IP est connu et augmente, la quantité de triènes des produits humides augmentera aussi mais de façon extrêmement modérée.

En conclusion, pour l'alimentation sèche testée, le taux de MG influe significativement et faiblement sur l'IP. Il n'est par contre pas corrélé aux taux de diènes et triènes conjugués. Le facteur « quantité de MG » n'est donc pas suffisant pour estimer l'altération future des corps gras d'un aliment ; il faut donc envisager d'autres critères pour évaluer leur statut et leur vitesse de dégradation.

Le taux de diènes est par contre directement relié à celui de triènes. En effet, plus l'absorbance est importante à 234 nm, plus elle le sera à 270 nm. Ces composés secondaires du rancissement apparaissent et augmentent d'une manière similaire ; un seul de ces deux paramètres suffit donc à estimer l'altération finale des corps gras.

Pour l'alimentation humide testée, nous pouvons en revanche affirmer que le taux de MG d'un aliment permet d'évaluer partiellement mais avec certitude son état oxydatif. En effet, plus le taux de MG est important, plus la quantité de peroxydes sera faible et plus la quantité de triènes sera faible. Cependant, il ne présage en rien de la quantité de diènes.

D'après l'étude que nous avons menée, il est impossible d'établir un lien de proportionnalité directe entre le taux de MG d'un aliment et son état d'oxydation complet. Cependant tout porte à croire que la cinétique de formation de ces composés oxydés ne suit pas une courbe linéaire; eux-mêmes pouvant être dégradés plus ou moins rapidement en d'autres molécules. En conséquence, pour estimer le potentiel oxydatif d'un aliment, il aurait fallu mesurer à intervalles réguliers l'ensemble des produits de la peroxydation depuis la sélection de la matière première jusqu'à plusieurs années après la date limite de consommation et il faudrait tenir compte de nombreux paramètres, certains encore mal connus.

III.3. Discussion

La présence des divers composés oxydés peut ou non se manifester au cours du temps. Cet état d'oxydation d'un aliment dépend de plusieurs paramètres. Nous allons essayer de les résumer en tenant compte des différentes étapes auxquelles sont soumis les aliments depuis leur préparation jusqu'à leur apport chez le chien et le chat. Chaque produit alimentaire suit un processus de fabrication au cours duquel de nombreux contaminants (102,104), dont les peroxydes, peuvent intervenir soit à cause de l'aliment lui-même soit à cause des traitements qu'il subit (additifs, stérilisation, emballage, transport) soit à cause de son environnement. C'est pourquoi, comme pour l'alimentation humaine, il s'agit d'une industrie extrêmement contrôlée et de plus en plus sûre.

III.3.1. Choix des matières premières

En effet, au départ de cette chaîne, il est important d'utiliser des matières premières fraîches et notamment des matières grasses non rances. Il convient donc de respecter un certain nombre de règles d'hygiène et de contrôle sur les aliments crus. Ainsi, ces produits seront le plus rapidement protégés, employés et traités pour éviter une oxydation importante.

De plus, les acides gras polyinsaturés, susceptibles de s'oxyder facilement, sont néanmoins essentiels à la composition d'une ration équilibrée. Il faut donc vérifier leur quantité et respecter notamment les ratios $\omega 3/\omega 6$. Plus largement, il faut limiter les lipides dans les aliments malgré leur apport énergétique et leur rôle bénéfique pour l'appétence. Ainsi un aliment avec un indice de peroxydes faible reste tout de même un danger potentiel si cet aliment contient beaucoup de matières grasses. Et inversement pour une ration équivalente un

aliment avec un taux de matières grasses faible peut avoir un indice de peroxydes plus élevé sans en augmenter la quantité globale.

Selon l'espèce destinataire et l'objectif physiologique ou thérapeutique des aliments, la qualité et la quantité des matières premières de l'aliment interviennent directement sur la quantité de peroxydes ingérée.

III.3.2. Type d'aliment

Hormis les matières grasses, d'autres facteurs interviennent sur la peroxydation des lipides. Nous allons ici parler de l'influence que peut avoir l'eau sur cette altération oxydative alimentaire. Constituant obligatoire de chacun des aliments industriels, elle apparaît cependant de façon très différente dans les aliments dits humides (boîtes de conserve) et les aliments dits secs (croquettes). Dans notre expérimentation il apparaît que si on étudie nos IP en fonction de la matière sèche (MS) de nos aliments (sans tenir compte du facteur eau), nous ne pouvons obtenir aucune corrélation ou régression linéaire significative entre ces deux types de données. Mais nous avons fait le choix de différencier les deux types d'aliments et fait l'étude en fonction de la MB, MB directement ingérée par l'animal et contenant donc de l'eau.

Dans la composition globale de ces aliments, l'eau intervient par sa quantité et mais aussi son activité. Un aliment sec est un aliment qui contient moins de 14% d'eau alors qu'un aliment humide en contient de 70 à 85% (99). Dans cette teneur globale en eau, les spécialistes et notamment C. Alais et G. Linden dans leur livre *Biochimie alimentaire* (éd. Masson, Paris, 1991) distinguent la part de l'eau liée directement aux composants de l'aliment et la part libre. L'activité de l'eau (souvent exprimée par le rapport aw) rend compte de la part libre de cet élément. Elle permet à condition de respecter une certaine valeur de stabiliser l'aliment et de limiter les phénomènes de rancissement. Selon le type précis de l'aliment, on peut obtenir un coefficient aw optimal (0,2/0,3) où l'inhibition de l'oxydation est maximale : au dessous de cette valeur, les hydroperoxydes deviennent moins stables et vont permettre la formation de radicaux libres; au dessus de cette valeur, le transport facilité et l'effet dilution des facteurs catalytiques ne permettront plus de contrôler la détérioration oxydative. A la vue de la teneur en eau de ce type d'aliment (supérieure à 50 %), il est à signaler que aw est souvent largement supérieur à 0,2 ou 0,3, et plutôt proche de 1. Aujourd'hui l'industrie alimentaire essaie de trouver des moyens divers de diminuer ce coefficient. Il est donc important pour les aliments humides de respecter une certaine composition en eau pour limiter la peroxydation au cours de leur conservation.

Il paraît plus aisé pour un aliment sec qui contient moins d'eau et surtout d'eau libre de limiter ces dégradations même s'il faut respecter le coefficient d'activité hydrique.

III.3.3. Technique de fabrication

Les produits subissent dans un premier temps un traitement thermique qui vise à assurer leur longue conservation (98,101).

Pour les boîtes, on utilise le procédé d'appertisation. Les aliments et donc les matières grasses sont soumis à une température supérieure à 100°C pendant plus d'une heure. La chaleur est toujours source d'oxydation des lipides. Plus un aliment y est soumis longtemps, plus l'oxydation est importante.

Pour les croquettes, il s'agit d'un phénomène d'extrusion : elles subissent l'effet de la pression et l'effet de la température (90 à 150°C) pendant quelques secondes seulement. Cette méthode semble produire moins de peroxydes compte tenu de la diminution du temps où

l'aliment est soumis à une forte température. De plus le mélange est au départ pauvre en matières grasses, elles ne sont rajoutées qu'après ce traitement en enrobage en fonction de l'objectif.

III.3.4. Méthode de conservation

Les aliments sont dans un autre temps conditionnés. Beaucoup de conditionnements se font maintenant sous atmosphère contrôlée (donc sans oxygène) et ainsi limitent les détériorations oxydatives (105).

Pour les boîtes, il s'agit de récipients étanches aux liquides, gaz et microorganismes. L'aliment n'est donc pas en contact avec le dioxygène retardant ainsi l'apparition de produits oxydés. Cette méthode datant des années 1920 est maintenant connue et maîtrisée. Les matériaux utilisés pour l'emballage de ces produits humides et les méthodes de sertissages ou de fermeture ont été étudiés et améliorés. Ainsi on évite par exemple les métaux qui favoriseraient le rancissement et on compense par des additifs spécifiques (98,104).

Pour les croquettes, on utilise aussi des emballages très sûrs qui les maintiennent à l'abri de la lumière mais l'oxygène peut être présent dans l'air contenu dans le paquet. Cette catégorie d'aliments domine aujourd'hui et s'impose de plus en plus par ses qualités nutritionnelles et sa praticité. Cependant, peu d'études encore ont pu déterminer l'altération lipidique dans le temps par ce système de fabrication.

Pour assurer une stabilité nutritionnelle et gustative à l'aliment qu'il soit sec ou humide, pour chien ou chat, les industries ont ajouté des additifs (104) capables de réduire significativement le rancissement et de compenser les pertes éventuelles. Il a été prouvé l'effet bénéfique d'un ajout d'antioxydants dans les aliments pour chiens et chats. Ces substances sont aussi incorporées dans les matières grasses dès leur extraction.

Mais aujourd'hui ne pouvant encore mesurer exactement l'altération oxydative d'un aliment et ne pouvant prévoir son évolution, on le supplémente dans les limites de la législation européenne mais sans réelle idée d'une dose compensatrice. Leur taux d'incorporation dépend des matières premières, de la durée de conservation, des particularités des destinataires, de la stabilité de l'aliment, de son coût,...

Les aliments humides une fois entamés et donc ouverts se conserveront moins bien : le contact de l'oxygène de l'air étant à l'origine d'une oxydation rapide. Ils supporteront donc moins bien la chaleur. Cependant ces produits sont conditionnés de façon à être utilisés rapidement : chaque boîte ne permet que peu de rations. Les aliments secs sont eux plus stables à l'ouverture de leur emballage : la détérioration lipidique se fera beaucoup plus lentement mais il s'agit de respecter certaines conditions d'hygiène (bien refermer l'emballage après chaque utilisation, ne pas soumettre à une température excessive, éviter de les conserver trop longtemps...)

En somme, les matières premières, mais aussi les procédés de fabrication et de conservation ainsi que l'ajout d'« anti-oxygène » sont autant de facteurs qui influent l'oxydation des matières grasses. Ces paramètres qui viennent s'ajouter au taux de matières grasses sont donc divers et varient en fonction du temps. C'est pourquoi il serait vraiment très intéressant d'étudier l'évolution de l'état oxydatif tout au long de cette chaîne et même après les dates limite de consommation indiquées sur un grand nombre de produits. Encore largement étudié et mal connu, les avancées visent à réduire ce phénomène dans le but de ne dépasser une quantité maximale de composés oxydés par ration journalière et par animal mais de nombreuses autres questions s'installent en même temps que les nouvelles technologies.

III.4. Applications

III.4.1. Rappel de pathologie

Ces produits oxydés instables que sont les radicaux libres ou les peroxydes, produits in vivo ou consommés ont été beaucoup étudiés ces dernières années et le sont encore. Il a été prouvé que ces composés sont impliqués dans la détérioration des lipides, des protéines et des acides nucléiques fondamentaux à l'organisme. L'ADN altéré semble être à l'origine de l'apparition de cancer dépendant étroitement du facteur âge. En effet les systèmes antioxydants semblent de moins en moins performants avec l'âge et ne peuvent plus réparer les dommages. Les lipides abîmés par ces peroxydes sont impliqués dans des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Quant à la glycosylation des protéines, elle semble intervenir dans l'évolution du diabète et de la cataracte.

III.4.2. Intérêt des antioxydants

Il a été montré que la principale méthode pour protéger l'alimentation et l'organisme de la peroxydation lipidique demeure la supplémentation des aliments en antioxydants et particulièrement en vitamine E.

III.4.2.1. Vitamine E

L'organisme dispose de plusieurs systèmes antioxydants dont la vitamine E fait partie. Ces systèmes sont en partie capables de se réguler en fonction de la quantité de radicaux libres et de peroxydes présents. Ces systèmes même s'ils limitent l'effet délétère des dérivés oxydés ne sont malheureusement pas toujours suffisants.

C'est pourquoi de nombreuses études ont tenté de démontrer l'effet bénéfique de l'ajout de vitamine E par l'alimentation et ce dès l'extraction des matières premières: une grande consommation de vitamine E est associée à un plus faible risque d'infarctus chez l'homme ; celle de carotène semble diminuer les risques d'infarctus chez les sujets fumeurs ; celle de vitamine C n'a pour le moment pas donné d'amélioration notable. De plus, la consommation de vitamine E semble diminuer de façon significative le risque de maladie coronarienne.

Il est donc intéressant de constater en fonction de l'aliment ingéré, c'est à dire de son taux de MG, de son état oxydatif et de sa quantité en antioxydants (surtout la vitamine E), de quelle quantité de vitamine E l'organisme dispose dans son sang et s'elle semble suffisante pour le protéger.

III.4.2.2. Expérimentation

Dans cette étude, nous avons dosé la vitamine E dans le sang de chiens nourris avec un des produits testés auparavant. L'étude a eu lieu en juin 1999.

Produit choisi :

Cet aliment est un aliment croissance (échantillon 12). Sa composition est la suivante:

Taux de MG	18% (MB)
Date limite de consommation	21/07/99
Vitamine E	50 mg/kg

et les valeurs trouvées sont :

Indice de peroxydes	6,4 meq/kg MG
Absorbance à 234 nm	0,6
Absorbance à 270 nm	0,1

Sujets testés :

Il s'agit de 5 chiens Beagle ne présentant aucune anomalie au moment du prélèvement sanguin, vivant en chenil depuis 2 ou 3 ans. En effet, les commémoratifs recueillis et un examen clinique succinct de chaque individu n'ont permis de déceler aucune maladie, notamment celles citées plus haut, impliquées dans l'action des peroxydes sur l'organisme.

Les chiens utilisés dans cette expérience sont décrits ci-dessous :

Michelin		6 ans
Micheline	QJE 4	7 ans
Droopy	M3W21	7 ans
Roudoudou	LNR 777	8 ans
Marrou		6 ans

Ils ont tous à peu près le même âge (à la limite des classes adulte/senior), le même poids et ont été élevés dans les mêmes conditions. Cette population est composée de deux femelles et trois mâles.

Ils mangent tous exclusivement l'aliment décrit ci-dessus, une ration adaptée à leur poids donc quasi identique pour tous les chiens depuis 1 an. Ils sont nourris avec un aliment riche en matière grasse et en énergie, normalement destiné à des animaux plus jeunes mais ces chiens sont des individus très actifs qui travaillent ; par conséquent, il a été choisi un aliment capable de compenser leurs dépenses énergétiques plus importantes que celles d'un chien sédentaire.

Méthode :

Le prélèvement sanguin a été réalisé à la jugulaire, avec un vacutainer et recueilli dans un tube avec héparinate de lithium (tube vert) dans des conditions usuelles d'asepsie lors de prises de sang.

Les cinq échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à 8° et à 3000 tours.

Le sérum a ensuite été prélevé puis congelé et enfin analysé dans les laboratoires de l'ENVT.

Résultats :

	Vitamine E (mg/L)
Michelin	10
Micheline	15
Droopy	17
Roudoudou	9
Marrou	11

Chez le chien, la concentration plasmatique de vitamine E est usuellement comprise entre 5 et 20 mg/L (en général entre 10 et 15 µg/ml)(43).

Les valeurs trouvées sont tout à fait dans les normes, elles ne sont en aucun cas diminuées malgré un indice de peroxydes légèrement élevé (entre 5 et 10 meq/kg) et un aliment presque périmé. Il semblerait donc que les produits de dégradation des lipides (peroxydes, diènes et triènes) n'aient pas provoqué une consommation significative du système antioxydant de l'organisme. Les chiens ne montrent aucune maladie cliniquement décelable que ce soit au niveau cardio-vasculaire, endocrinien, cancérologique ou oculaire; ainsi les quantités de peroxydes et de produits conjugués dans nos aliments ne peuvent pas être tenues responsables d'une affection quelconque après douze mois d'utilisation.

Elles ne sont pas non plus augmentées, ce qui indique que la supplémentation en vitamine E est suffisante pour couvrir les besoins de base de l'organisme des chiens prélevés mais probablement insuffisante pour faire face à un stress oxydatif important ultérieur. Aujourd'hui on cherche à obtenir une augmentation de la concentration plasmatique en vitamine E de 50%, pour ce faire l'apport correspond à 10 à 20 fois les besoins nutritionnels minimaux des chiens et des chats (43).

En somme, la présence de ces radicaux libres de l'oxygène n'a pas eu d'effets au moment de l'étude sur l'organisme de sujets en bonne santé; ou bien que leur quantité ait été insuffisante et leur temps d'action trop court; ou bien que la supplémentation en vitamine E de l'aliment ait suffi à neutraliser ces composés de dégradation.

CONCLUSION

Chez le chien et le chat, comme chez l'homme, les radicaux libres de l'oxygène et en particulier les peroxydes sont des molécules instables, à l'origine de la dégradation des lipides, protéines et acides nucléiques de l'organisme. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses maladies, notamment au moment du vieillissement. L'alimentation industrielle de nos animaux de compagnie est une source possible de peroxydes et peut engender un stress oxydatif non négligeable.

Contrairement à ce que nous pouvions envisager, les peroxydes de nos échantillons ne semblent pas en quantité plus importante si le taux de matière grasse est élevé. Pour nos aliments testés, la quantité de peroxyde varie même de façon inverse avec le taux de matière grasse, sans que les produits secondaires soient pour autant en nombre plus importants.

Les chiens et chats sont nourris aujourd'hui souvent avec le même aliment, riche en matières grasses, sur de très longues périodes de temps. Néanmoins, l'aliment choisi dans cette étude, malgré un indice de peroxyde relativement élevé n'a pas révélé de trouble chez les chiens du chenil.

Ainsi, il faut avouer qu'il est très difficile d'évaluer l'état oxydatif complet d'un aliment et surtout sa capacité à être responsable d'affections particulières. Il faudrait pour cela répéter ces expérimentations sur un temps beaucoup plus long et sur nombre d'échantillons et d'individus plus important. Toutefois, l'effet délétère des peroxydes est indéniable et reconnu. C'est pourquoi les entreprises agroalimentaires consacrent actuellement à leur étude une part non négligeable de leur budget et ont d'ores et déjà supplémenté de manière significative leurs produits en antioxydants, de sorte que la ration quotidienne d'un animal (quelque soit son statut physiologique) contienne à peu près une dose identique minimale d'anti-oxygène.

Annexe : Méthode AOAC (dosage des peroxydes)

Méthode AOAC : AOAC Official Method 965.33
Peroxyde Value of Oils and Fats
Titration Method
First Action 1965
Final Action 1969
AOCS – AOAC Method

(Note :Conduct analysis in diffuse daylight or in artificial light shielded from direct light source.)

Reagents

- Acetic acid – chloroform solution.

Mix 3 volumes CH₃COOH with 2 volumes CHCl₃, USP.

- Potassium iodide solution, saturated.

Dissolve excess KI in freshly boiled H₂O. Excess solid must remain. Store in dark. Test daily by adding 0.5 mL to 30 mL CH₃COOH-CHCl₃, (a) ; then add 2 drops 1% starch solution, (mix ca 1 g soluble starch with enough cold H₂O to make thin paste, add 100 mL boiling H₂O, and boil ca 1 min while stirring). If solution turns blue, requiring >1 drop 0,1 N Na₂S₂O₃ to discharge color, prepare fresh solution.

- Sodium thiosulfate standard solutions.

0,1 and 0,01 N. Prepare and standardize as in 942,27 (see A.1.13). For 0,01 N, dilute 0,1 N with freshly boiled and cooled H₂O.

Determination

- Fats and oils.

Weigh 5,00 +/- 0,05 g sample into 250 mL glass-stoppered Erlenmeyer. Add 30 mL CH₃COOH-CHCl₃, (a), and swirl to dissolve. Add 0.5 mL saturated KI solution, (b), from Mohr pipet, let stand with occasional shaking 1 min, and add 30 mL H₂O. Slowly titrate with 0.1 N Na₂S₂O₃ with rigorous shaking until yellow is almost gone. Add ca 0,5 mL 1 % starch solution, and continue titration, shaking vigorously to release all I₂ from CHCl₃ layer, until blue just disappears. If < 0,5 mL 0.1 N Na₂S₂O₃ is used, repeat determination with 0,01 N Na₂S₂O₃.

Conduct blank determination daily (must be < 0,1 mL 0.1 N Na₂S₂O₃). Subtract from sample titration.

Peroxyde value (milliequivalent peroxyde / kg sample) = $S \times N \times 1000 / g \text{ sample}$, where S = mL Na₂S₂O₃ (blank corrected) and N = normality Na₂S₂O₃ solution.

- Margarine

Melt sample by heating with constant stirring on hot plate at low heat, or heat in air oven at 60-70°. (Avoid excessive heat and long exposure > 40°). When completely melted, hold in warm place until aqueous portion and most of solids have settled. Decant oil into clean beaker and filter through Whatman No. 4, or equivalent paper. Do not reheat unless necessary to obtain clear filtrate. Proceed as in (a).

References : J. Am. Oil Chem. Soc. 26, 345(149).

AOCS Method Cd 8-53.

JAOAC 48, 175(1965).

Références bibliographiques

1. Adams, J., Odunze, I.
Oxygen free radicals and parkinson's disease.
Free Rad. Biol. Med., 1991, Vol.**10**, p.161-169.
2. Addis, P.B., Carr, T.P., Hassel, C.A., Huang, Z.Z., Warner G.J.
Atherogenic and anti-atherogenic factors in the human diet.
In: Biochemistry Society Symposium, 1995, **61**, 259-272.
3. Allen, J.I., Kay, N.E., McClain, C.J.
Severe zinc deficiency in humans: association with a reversible T-Lymphocyte dysfunction.
Ann Intern Med, 1981, **95**, 154-157.
4. Babos, S.
Espèces réactives de l'oxygène et exposition professionnelle à des substances organiques ou minérales.
In : Travail et santé, 1996, Vol **12** n°3, p. S15-S18.
5. Beccaroo, F., Pacini, G., Valerioo, A. et al.
Age and glucose tolerance in healthy subjects.
Aging, 1990, **2**: 277-282.
6. Biagi, P.L., Bordoni, A., Hrelia, S. et al.
Gamma-linoleic acid dietary supplementation can reverse the aging influence on rat liver microsome delta-6-desaturase activity.
Biochem. Biophys. Acta., 1991, 1083:187.
7. Blast, A., Haenen, G., Doelman, C.
Oxidants and antioxidants: State of the Art.
Am. J. Med., 1991, Vol.**91**, p 3C-2S à 3C-13S.
8. Bui, L.M., Ramsley, R.A., Wattam, S., Marshall, M.D.
Altered antioxidant status and induced oxidative damage in small dogs during anesthesia.
Journal of Veterinary Internal Medicine, 2000, **14**, 388.
9. Burk, R.F., Hill, K.E.
Some properties of selenoprotein P.
Biol. Trace Elem. Res., 1992, **33**: 151-3.
10. Byers, T., Guerrero, N.
Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention.
Am J Clin Nutr, 1997, **62**, 1385S-1392S.
11. Carmena, R., Ascaso, J.F., Camejo, G. et al.
Dietary composition and low density lipoproteins (LDL) modifications.
In: Abstracts of the 11th International Symposium on Atherosclerosis, 1997, Abstract 1.WO 7-1: p. 14.

12. Charlton, C.J., Marshall, M.D., Wattam, S.L., Robertson, A.D., Smith, B.H.E., O'Reilly, J., Harper, E.J.
Influence of age on antioxidant enzyme status in cats.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.9.
13. Charlton, C.J., Wattam, S.L., Smith, B.H.E., Harper, E.J., Marshall, M.D.
Glutathione peroxidase: Assay validation and normal ranges in cats.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.10.
14. Charlton, C.J., Robertson, A.D., Smith, B.H.E., Harper, E.J.
Erythrocyte catalase activity in dogs.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.11.
15. Charlton, C.J., Robertson, A., Skinner, N.D., Smith, B.H.E., Harper, E.J.
Erythrocyte catalase activity in cats.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.12.
16. Charlton, C.J., Marshall, M.D., Smith, B.H.E., Harper, E.J.
Assay validation and normal ranges of plasma total antioxidant capacity and vitamin C concentrations in cats.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.13.
17. Charlton, C.J., Marshall, M.D., Smith, B.H.E., O'Reilly, J., Grolier, P., Pelissier Treunov, E., Harper, E.J.
Feeding an antioxidant fortified diet increases the antioxidant capacity of cats.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 749-521.9.
18. Charlton, C.J., Wattam, S.L., Skinner, N.D., Harper, E.J.
Validation and normal ranges of plasma ceruloplasmin concentration in cats and dogs.
The FASEB Journal, 1999, **13**, 4: p A 578-451.18.
19. Chew, B.P., Park J.S., Wong, D.S. et al.
Importance of beta-carotene nutrition in the dog and cat: Uptake and immunity.
In: Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Vol II. Iams Nutrition Symposium Proceedings, 1998, 513-522.
20. Chew, B.P., Park J.S., Wong, D.S. et al.
Role of dietary lutein in the dog and cat.
In: Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Vol II. Iams Nutrition Symposium Proceedings, 1998, 547-554.
21. Chugh, S.N. et al.
An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation.
J. Assoc. Physicians India, 1999, **47**: 380-383.
22. Dandona P et al.
The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, **86**: 355-362.

23. Davies, M.
An introduction to geriatric veterinary medicine.
In: Canine and Feline Geriatrics, 1996, 1-11.
24. Davis, P.J., Davis, J.B.
Endocrinology and aging.
In: Clinical Aspects of Aging, 1983, 396-410.
25. Deby, C.
La Biochimie de l'oxygène.
In : La recherche n°228, 1991, p. 56-64.
26. Deschamps-Latcha, B., Witko-Sarsat, V.
Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure.
Kidney Int., 2001, Suppl. **78**: S108-113.
27. Devlin, P., Koelsch, S., Heaton, P.R., Charlton, C.J., O'Reilly, J., Smith, B.H.E., Harper, E.J.
Effects of antioxidant supplementation on the immune response in weaned puppies.
Journal of Veterinary Internal Medicine, 2000, **14**, 361.
28. De Waart, F.G., Moser, U., Kok, F.J.
Vitamin E supplementation in the elderly lowers the oxidation rate of linoleic and arachidonic acid in LDL.
Abstract '6th World Congress on Clinical Nutrition: Antioxidants and Disease', Banff, Alberta, 1997.
29. Dobarganes, C., Marquez-Ruiz, G.
Oxidized fats in foods.
Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003, **6**(2): 157-63.
30. Eder, K., Suelzle, A., Skufa, P., Brandsch, C., Hirche, F.
Effects of dietary thermoxidized fats on expression and activities of hepatic lipogenic enzymes in rats.
Lipids, 2003, **38**(1): 31-8.
31. Eder, K., Keller, U., Hirche, F., Brandsch, C.
Thermally oxidized dietary fats increase the susceptibility of rat LDL to lipid peroxidation but not their uptake by macrophages.
J Nutr., 2003, **133**(9): 2830-7.
32. Esterbauer, H., Wag, G., Puhl, H.
Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis.
Br. Med. Bull., 1993, **49**: 566-576.
33. Favier, A., Sappey, C., Leclerc, P., Faure, P., Micoud, M.
Antioxidant status and lipid peroxidation in patients infected with HIV.
Chemico-Biol. Interact., 1994, **91**: 165-180.

34. Fiskum, G., Murphy, A.N., Beal, M.F.
Mitochondria in neurodegenerative acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases.
J. Cereb. Blood Flow Metab., 1999, **19**: 351-369.
35. Fredericks, W.M., Bosch, K.
Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues.
Free radical Biology and Medicine, 1996, **22**, 241-248.
36. Freeman, L.M. et al.
Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1999, **215**: 644-646.
37. Grases F. et al.
Development of calcium oxalate crystals on urothelium: Effects of free radicals.
Nephron, 1998, **78**: 296-301.
38. Greeley, E.H., Kealy, R.D., Ballman, J.M. et al.
The influence of age on the canine immune system.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996, **55**: 1-10.
39. Grundy, S.M., Denke, M.A.
Dietary influences on serum lipids and lipoproteins.
J. Lipid Res., 1990, **31**: 1149-72
40. Halliwell, B.
How to characterize an antioxidant: an update.
In: Biochemistry Society Symposium, 1995, **61**, 73-101.
41. Halliwell, B.
Free radicals and antioxidants: a personal view.
Nutrition Reviews, 1994, **52**, 253-265.
42. Harman, D.
Aging: Prospects for further increases in the functional lifespan.
Age, 1994, **17**, 119-146.
43. Harper, E.J.
Utilisation des antioxydants en clinique.
Waltham Focus, 2000, Vol. 10, N°4.
44. Harper, E.J., Frith, N., Blount, S., Charlton, C.J., O'Reilly, J., Smith, B.H.E.
Total plasma antioxidants status in kittens.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 518-363.14.
45. Harper, E.J.
Optimum nutrition for healthy longevity.
WSAVA Proceedings, 2000, 473-474.

46. Harper, E.J.
Dietary antioxidants in cat and dog nutrition.
Waltham Focus, 1999, **9**, 2: 32.
47. Hassan, H.M.
Biosynthesis and regulation of superoxyde dismutases.
Free Radical Biology and Medecine, 1988, **5**: 377-385.
48. Hayek, M.G.
Age-related changes in physiological function in the dog and cat. Nutritional implications.
In: Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Vol II. Iams Nutrition Symposium Proceedings, 1998, 353-362.
49. Hayek, M.G., Kearns, R.J., Turek, J.T. et al.
Effect of age and dietary omega 6:3 fatty acid ratio on the immune response of fox terriers and labrador retrievers.
Proceedings of the 16th Meeting of the American College of Veterinary Medicine, 1998.
50. Hodson, J.M., Wahlquist, M.L., Baxall, J.A., Balaz, S.
Can linoleic acid contribute to coronary artery disease?
Am J Clin Nut, 1993, **58**: 228-34.
51. Jadot, G.
Les superoxydes dismutases: biochimie, pharmacologie, thérapeutique.
Editions Masson, 1988.
52. Koelsch, S., Smith, B.H.E.
Strengthening the barriers against feline infectious diseases: The benefits of antioxidants.
Waltham Focus, 2001, **11**: 2.
53. Kountouras, J. et al.
Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases.
Hepatogastroenterology, 2001, **487**: 743-751.
54. Kraus, A., Roth, H.P., Kirchgessner, M.
Supplementation with vitamin C, vitamin E or B-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats.
J Nutr, 1997, **127**, 1290-1296.
55. Lachance, P.A.
Micronutrients in cancer prevention.
In : American Chemical Society Symposium Series, 1994, p. 49-64.
56. Langsteh, L.
Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention.
Brussels, International Life Sciences Institute Europe, 1995.
57. Meydani, S.N., Hayek, M.G.
Vitamin E and aging immune response.
Clin. Geriatr. Med., 1995, **11**: 567-576.

58. Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S.
Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects.
Am J Clin Nutr, 1990, **52**, 557-563.
59. Minotti, G., Di Gennaro, M., D'Ugo, D., Granone, P.
Possible sources of iron for lipid peroxidation.
Free Rad. Res. Comm., 1991, **12/13**, 99-100.
60. Monnier, L., Avignon, A., Boegner, C., Colette, C.
Alimentation et athérosclérose.
In : Les mécanismes d'action et les stratégies diététiques. STV, 1997, **9**: 428-37.
61. Monnier, L., Perrin, M., Colette, C., Descamps, B.
Relations acides gras alimentaires et hémostasie.
Rev Nut, 1995, **8** : 70-4.
62. Mosier, J.E.
Effect of aging on body systems in the dog.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Prac., 1989, **19**: 1-12.
63. Nelson, R.L.
Dietary iron and colorectal cancer risk.
Free Rad. Biol. Med., 1992, **12**: 161-168.
64. Neve, J., Favier, A.
Selenium in Medicine and Biology.
Walter de Gruyter, Berlin New-York, 1988.
65. Obra, R., Harper, E.J., Lunec, J.
Exercise in healthy adult dogs increases plasma tbars - an indicator of oxidative stress.
The FASEB Journal, 1999, **13**, 4: p A 565-446.18.
66. Olanow, C. W.
A radical hypothesis for neurodegeneration.
In: TINS., 1993, Vol.16, n°11, p. 439-444.
67. O'Reilly, J., Charlton, C.J., Smith B.H.E., Harper, E.J.
Mild sedation causes oxidative stress in domestic dogs.
The FASEB Journal, 2000, **14**, 4: p A 200-144.13.
68. Palmer, H.J., Paulson, K.E.
Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression.
Nutrient Reviews, 1997, **55**, 353-361.
69. Pincemaille, J.
Free radicals and antioxidants in human diseases.
In: Analysis of free radicals in biologicals systems, 1995, p83-98.

70. Pryor, W.A.
Introduction to free radical chemistry.
In: Foundation of modern organic chemistry, 1966.
71. Pryor, W.A.
The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis.
In: Anti-carcinogenesis and radiation protection, 1987, 71-80.
72. Reaven, P.D., Parthasaraty, S., Grasse B.S. et al.
Effects of oleate rich and rich linoleate diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects.
J Clin Invest, 1993, **91**: 668-76.
73. Reckelhoff, J.F. et al.
Vitamin E ameliorates enhanced renal lipid peroxidation and accumulation of F2-isoprostanes in aging kidneys.
Am J. Physiol., 1998, **274**: R 764-R774.
74. Reed, D.J.
Interaction of Vitamin E, ascorbic acid, and glutathione in protection against oxidative damage.
In: L. Packer and J. Fuchs (Eds) Vitamin E in Health and Disease, 1993, p. 269-281.
75. Richard, M.J. et al.
Les Glutathion peroxydases: Intérêt de leur dosage en biologie clinique.
Annales de Biologie Clinique, 1997, **55**, 3, 195-207.
76. Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A., Willett, W.C.
Vitamin E consumption and risk of coronary heart disease among men.
N Engl J Med, 1993, **328**, 1450-1456.
77. Rohrmoser, M.M., Mayer, G.
Reactive oxygen species and glomerular injury.
Kidney Blood Press, 1996, Res. **19**: 262-269
78. Rusbridge, C.
Brain ageing in dogs.
Presented at Breakthrough Nutrition to Help Manage Brain Ageing-related Behavioural Changes, London, 2002.
79. Rustin, P., Von Kleist-Retzow, J.C., Vajo, Z., Munnich, A.
Defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or myth-ochondria.
Mechan Age Dev, 2000, **114**:201-206.
80. Sharma, R.
Theories of aging.
In: Physiological Basis of Aging and Geriatrics, 1994, 37-46.

81. Sheffy, B.E., Williams A.J., Zimmer, J.F. et al.
Nutrition and metabolism of the geriatric dog.
Cornell Veterinarian, 1985, **75**: 324-347.
82. Sherman, A.R.
Zinc, copper and iron nutriture and immunity.
J Nutr, 1992, **122**, 604-609.
83. Singal, P.K., Kirshenbaum, L.A.
A relative deficit in antioxidant reserve may contribute in cardiac failure.
Can. J. Cardiol., 1990, **6**: 47-49.
84. Smith, L.J., Shamsuddin, M., Sporn, P.H.S., Denenberg, M., Anderson, J.
Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma.
Free Radical Biology and Medicine, 1997, **22**(7), pp 1301-1307.
85. Srinivasan, K.N., Pugalendi, K.V.
Effect of excessive intake of thermally oxidized sesame oil on lipids, lipid peroxidation and antioxidants' status in rats.
Indian J Exp Biol., 2000, **38**(8): 777-80.
86. Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B., Willett, W.C.
A prospective study of vitamin E consumption and risk of coronary disease in women.
N Engl J Med, 1993, **328**, 1444-1449.
87. Staprans, I., Pan, X.M., Rapp, J.H., Feingold, K.R.
Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum.
J Lipid Res., 2003, **44**(4): 705-15.
88. Staprans, I., Hardman, D.A., Pan, X.M., Feingold, K.R.
Effect of oxidized lipids in the diet on oxidized levels in postprandial serum chylomicrons of diabetic patients.
Diabetes Care, 1999, **22**(2): 300-6.
89. Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Hardman, D.A., Feingold, K.R.
Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits.
Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1996, **16**(4): 533-8.
90. Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Kim, K.Y.
Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum.
Arterioscler Thromb., 1994, **14**(12): 1900-5.
91. Stufca, P., Brandsch, C., Hirche, F., Eder, K.
Effects of a dietary thermally oxidized fat on thyroid morphology and mRNA concentration thyroidal iodide transporter and thyroid peroxydase in rats.
Ann Nutr Metab., 2003, **47**(5): 207-13.

92. Sun, Y.
Free radicals, antioxidants enzymes, and carcinogenesis.
Free Rad. Biol. Med., 1990, Vol.8, p. 583-599.
93. Taylor, A., Jaques, P.F., Epstein, E.M.
Relations among ageing, antioxidant status and cataract.
Am J Clin Nutr, 1995, **62**, 1439S-1447S.
94. Traber, M.G., Packer, L.
Vitamin E: beyond antioxidant function.
Am J Clin Nutr, 1995, **62**, 1501S-1509S.
95. Turek, J.J., Watkins, B.A., Schoenlein, I.A., Allen, K.G., Aldrich, C.G.
Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation.
J Nutr Biochem., 2003, **14**(1): 24-31.
96. Warner, H.R.
Superoxide Dismutase, Aging, and degenerative disease.
Free Rad. Biol. Med., 1994, Vol.17, n°3, p. 249-258.
97. Yanishlieva, N.V., Goranov, I.M., Tsanev, R.B.
UV spectroscopy studies of the oxidation change of depot and structural lipids in high-fat feeding.
Nahrung, 1988, **32** (10): 995-60.
98. Site internet : http://perso.wanadoo.fr/génie_alimentaire (Génie des procédés / Conservation des aliments / appertisation, cuisson-extrusion et Thèmes / l'emballage).
99. Site internet : <http://www.afssa.fr> (Risques et bénéfices des acides gras trans apportés par les aliments – recommandations alimentaires).
100. Site internet : http://www.anastore.com/produits/radicaux_libres.php (Radicaux libres).
101. Site internet : <http://www.aniwa.com> (L'alimentation industrielle) .
102. Site internet : <http://www.caducee.net> (La sécurité des aliments, P. Martel, INRA et Emballages alimentaires et sécurité du consommateur, A.-M. Riquet, INRA).
103. Site internet : <http://www.centre-evian.com> (Oligo-éléments et stress oxydant, Pr. Favier).
104. Site internet : <http://www.codexalimentarius.net> (Publications spéciales/Hygiène des aliments/Textes de base 2001 : Commission du Codex Alimentarius et programme sur les normes alimentaires FAO/OMS et Normes Codex officielles/Principes généraux pour l'utilisation d'additifs alimentaires(1), code d'usages concernant les mesures prises à la source pour réduire la contamination chimique (49), code d'usages en matière d'hygiène pour les conserves d'aliments peu acides conditionnées aseptiquement (40)).

105. Site internet : <http://www.eufic.org> (Food today n°5 : Sécurité et qualité des produits alimentaires : le rôle de la fabrication et Food today n°33 : De quoi s'emballer ! – Du neuf dans le domaine de l'emballage alimentaire).
106. Site internet : <http://www.inra.fr/productions-animales> (Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leur produits, Aurousseau, INRA Prod. Anim., 2002,15(1), 67-82).
107. Site internet : http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmaco/radicaux_libres.htm (Pharmacologie des radicaux libres : application à la dégénérescence, Pr. H. Allain).
108. Site internet : <http://www.pharmacorama.com> (Vitamine E, P. Allain, Les médicaments, 3^e éd.).
109. Site internet : <http://www3.sympatico.ca/diane.demers/rech2.htm> (Espèces réactives de l'oxygène et Antioxydants)